

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELLE ZIBETTI TADRA SFEIR

**Caracterização funcional de genes de *Herbaspirillum*  
*seropedicae* regulados pelo flavonóide naringenina**

**CURITIBA**

2011

MICHELLE ZIBETTI TADRA SFEIR

**Caracterização funcional de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo flavonóide naringenina**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica  
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica,  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Rose Adele Monteiro  
Co-orientador: Dr. Emanuel M. de Souza

**CURITIBA**

2011

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Sfeir, Michelle Zibetti Tadra

Caracterização funcional de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo flavonóide naringenina. / Michelle Zibetti Tadra Sfeir. – Curitiba, 2011.

127 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Rose Adele Monteiro

Co-orientador: Emanuel M. de Souza

Tese (dissertação) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. *Herbaspirillum* 2. Flavonoides I. Título II. Monteiro, Rose Adele III. Souza, Emanuel M. de Souza IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

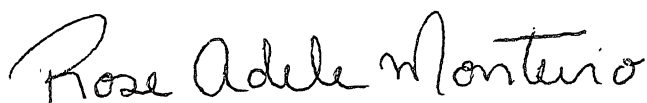
CDD (20 ed ) 589 95

## TERMO DE APROVAÇÃO

MICHELLE ZIBETTI TADRA SFEIR

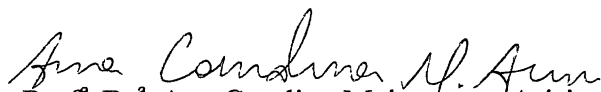
### **CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE GENES DE *Herbaspirillum seropedicae* REGULADOS PELO FLAVONÓIDE NARINGENINA**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora



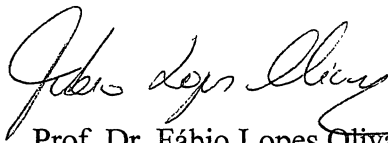
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rose Adele Monteiro (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



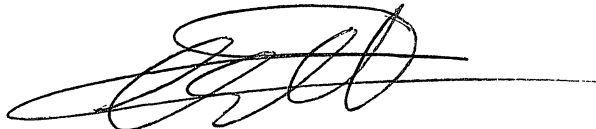
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Carolina Maisonnave Arisi

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC



Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF



Dr. Christian Macagnan Probst

Instituto Carlos Chagas – Fiocruz PR



Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Orietadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rose Adele Monteiro  
Prof. Dr Emanuel Maltempi de Souza

Ao meu marido Rafael por toda sua paciência,  
dedicação, amor e apoio incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dr<sup>a</sup> Rose Adele Monteiro pela orientação, apoio, paciência e sua amizade. Agradeço por todas suas idéias e confiança, além de todo seu carinho e atenção. Para sempre minha mãe científica.

Ao professor Dr. Emanuel Maltempi de Souza, pela orientação e oportunidade de trabalhar no grupo. Suas idéias e seu senso crítico foram fundamentais para a realização deste trabalho. Além disso obrigada pela paciência, pelo seu incentivo, pela amizade e principalmente por todo o apoio, acreditando sempre que eu seria capaz de fazer todas as tarefas necessárias.

Gostaria de agradecer aos meus dois orientadores, Rose Adele e Emanuel, por toda a paciência e auxílio em todas as reuniões e em todas as conversas paralelas pelos corredores, que foram essenciais não somente para esta dissertação, mas também para minha formação científica.

Ao professor Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio, pelo seu apoio e grande exemplo profissional e por todas as idéias e discussões sobre o trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup> Roseli Wassem pelo seu apoio, amizade, idéias e por toda atenção dispensada nas discussões.

Aos professores do laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio Dr<sup>a</sup> Liu Un Rigo, Dr Leonardo Cruz Magalhães, Dr Marcelo Müller Santos, Dr<sup>a</sup> Leda Chubatsu e Dr<sup>a</sup> Maria Berenice Steffens pela ajuda, sugestões, amizade, carinho e conselhos.

Ao pessoal do anexo, Eduardo, Marcelo Batista e Tuca pela atenção e por toda a alegria do dia-a-dia. A Thalita por todo seu carinho e apoio.

Ao pessoal do transcriptoma, Liziane, Doumit, Vânia e Paloma por todo o apoio, alegria, por todas as discussões, que acredito serem muito válidas, e claro pelas madrugadas com muitas risadas mas muito trabalho ao mesmo tempo. Ao Vinicius pelas análises de bioinformáticas e também por toda sua atenção dispensada.

À minha “irmã científica” Anelis por sua amizade, risadas e ajuda em todos os momentos.

Ao Valter pelas cantorias e claro por todo seu auxílio (indispensável), amizade, carinho e compreensão nas horas desesperadoras.

Ao Helissom por toda sua paciência em todos os momentos, por toda sua ajuda e também pela sua colaboração nos experimentos e nas discussões dos resultados e ainda pela minha formação.

À Dona Jú por toda sua atenção, apoio e carinho. A D. Marilza pelas conversas e apoio.

À Roseli Prado em especial, por toda paciência, auxílio, apoio, amizade e carinho.

À toda família, por todo apoio e incentivo. Aos meus pais pelo apoio, orgulho e carinho. Aos meus irmãos, pela admiração e seu apoio e a Tere pelo incentivo e por todo seu cuidado.

À coordenação de Pós-Graduação em Bioquímica e a todas as Instituições Financiadoras, particularmente ao INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio financeiro e a CAPES/REUNI e CNPq pela bolsa de estudos.

Ao meu super marido Rafael, principalmente por toda sua paciência, acredito que isto resume tudo o que ele faz e passa por mim, mas também gostaria de agradecer por todo seu infinito apoio além de seu dedicado e incondicional amor. Por fim queria agradecer a princesinha, Gabriela, que esta dentro de mim e que traduz todo o amor que eu e o Rafa sentimos um pelo outro e tenho certeza que nos trará muita alegria e orgulho, além de me trazer muita força e vontade de continuar a trabalhar e crescer pessoalmente e profissionalmente.



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xviii</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	3
2.2 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.....	4
2.2.1 Flavonóides.....	8
2.2.1.1 Sistema de Secreção do Tipo III.....	12
2.2.1.2 Lipopolissacarídeos e Exopolissacarídeos.....	13
2.3 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL.....	16
2.3.1 Transcriptoma .....	18
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 Objetivos específicos.....	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 BACTÉRIAS E PLAMÍDEOS.....	24
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	25
4.3 ANTIBIÓTICOS.....	27
4.4 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	27
4.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO .....	28
4.5.1 Preparo de células de <i>E. coli</i> eletrocompetentes .....	28
4.5.2 Transformação bacteriana por eletroporação.....	28
4.6 PURIFICAÇÃO DE DNA CROMOSSÔMICO DE <i>H. seropedicae</i> .....	29
4.7 ELETROFORESE DE DNA.....	29
4.8 SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	30
4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASE .....	30
4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	31

4.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE LPS (LIPOPOLISSACARÍDEOS) DAS ESTIRPES MUTANTES POR DOC-PAGE .....	31
4.12 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME .....	32
4.13 ENSAIOS DE COLONIZAÇÃO E ADESÃO EM PLÂNTULAS DE MILHO..	33
4.13.1 Esterilização das sementes de milho .....	33
4.13.2 Ensaio de adesão a raiz de milho.....	33
4.13.3 Ensaio de colonização endofítica da raiz de milho .....	33
4.14 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL .....	34
4.14.1 Isolamento de RNA total pelo método do Trizol .....	35
4.14.2 Síntese de cDNA .....	36
4.14.3 Reação de PCR em Tempo Real .....	36
4.15 TRANSCRIPTOMA.....	36
4.15.1 Isolamento de RNA total.....	36
4.15.2 Tratamento com DNaseI .....	36
4.15.3 Precipitação das amostras de RNA.....	37
4.15.4 Depleção de rRNA.....	37
4.15.5 Construção e sequenciamento das bibliotecas de cDNA .....	37
4.15.6 Análise do transcriptoma .....	37
<b>5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES MUTADOS DAS ESTIRPES MHS05, MHS06, MHS11 E MHS13 DE <i>H. seropedicae</i> .....	39
5.1.1 ESTIRPE MUTANTE MHS05 .....	41
5.1.2 ESTIRPE MUTANTE MHS06 .....	44
5.1.3 ESTIRPE MUTANTE MHS11 .....	44
5.1.4 ESTIRPE MUTANTE MHS13 .....	44
5.2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS ESTIRPES MUTANTES .....	45
5.3 PADRÃO ELETROFORÉTICO DE LPS DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	45
5.3.1 Análise do Lipídeo-A do LPS da estirpe selvagem e da estirpe MHS05 .....	46
5.4 CAPACIDADE DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> DE FORMAR BIOFILME.....	49

5.5 ENSAIOS DE ADESÃO E COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA EM PLANTAS DE MILHO.....	54
5.6 ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MHS05 DE <i>H. seropedicae</i> .....	56
5.7 ANÁLISE DE PERFIL DE MEMBRANA DAS ESTIRPES MUTANTES .....	58
5.8 AVALIAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ INOCULADAS COM <i>H. seropedicae</i> ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES ATRAVÉS DA ANÁLISE MORFOLÓGICA E PESO SECO.....	60
5.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> NA PRESENÇA DE EXTRATO DE CANA DE AÇÚCAR.....	62
5.10 AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NARINGENINA	65
5.11 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 DE <i>H. seropedicae</i> NA PRESENÇA DE NARINGENINA ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL.....	68
5.12 TRANSCRIPTOMA.....	78
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>119</b>
Anexo I - Genes Ativados na presença de naringenina .....	119
Anexo II - Genes Reprimidos na presença de naringenina .....	123

# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - MODELO PROPOSTO PARA CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDE-NODD1 EM <i>Rhizobium</i> NGR234.....	7
FIGURA 02 – VIA DE SÍNTESE DE FENILPROPANÓIDES .....	9
FIGURA 03 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES.....	9
FIGURA 04 – CLASSES DE FLAVONÓIDES .....	10
FIGURA 05 – REPRESENTAÇÃO MOLECULAR DO ENVELOPE CELULAR DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVAS.....	15
FIGURA 06 - MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pTnMod-OGmKm/ <i>lacZ</i> (SCHWAB <i>et al.</i> , 2007).....	40
FIGURA 07 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TnMOD- OGmKm/ <i>LacZ</i> NO GENOMA DAS ESTIRPES MUTANTES .....	42
FIGURA 08 - ANÁLISE DE VIZINHANÇA DO GENE QUE CODIFICA PARA PROTEÍNA AmpG EM $\beta$ -PROTEOBACTÉRIAS.....	43
FIGURA 09 – PADRÃO ELETROFORETICO DE LPS DA ESTIRPE MUTANTE MHS05 E DA ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	47
FIGURA 10 – ESPECTRO DE MALDI-TOF DO LIPÍDEO-A DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 E DA ESTIRPE MUTANTE MHS05 DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i> .....	48
FIGURA 11 – ENSAIO QUALITATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 DE <i>H. seropedicae</i> . ....	50
FIGURA 12 – ENSAIO QUALITATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 DE <i>H. seropedicae</i> NO DECORRER DE 35 HORAS.....	50
FIGURA 13 – ENSAIO QUANTITATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 DE <i>H. seropedicae</i> NO DECORRER DE 35 HORAS.....	51
FIGURA 14 – ENSAIO QUANTITATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS ESTIRPES MUTANTES MHS05 E MHS15.....	52

FIGURA 15 – ENSAIO QUANTITATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS ESTIRPES MUTANTES NA PRESENÇA DE NARINGENINA. ....	53
FIGURA 16 – PADRÃO DE ADESÃO DAS ESTIRPES MUTANTES .....	55
FIGURA 17 – PADRÃO DE COLONIZAÇÃO DA ESTIRPE SELVAGEM E DA ESTIRPE MH05 (AmpG).....	55
FIGURA 18 – PADRÃO DE ADESÃO DA ESTIRPE SELVAGEM E DA ESTIRPE MH05 NA PRESENÇA DE <i>N</i> -acetilglucosamina .....	56
FIGURA 19 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTISPE MUTANTE MHS05 E SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> .....	57
FIGURA 20 - PERFIL DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DA ESTIRPE SELVAGEM (SmR1) E DAS ESTIRPES MUTANTES NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NARINGENINA.....	59
FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS PLANTAS DE ARROZ INOCULADAS COM AS ESTIRPES MUTANTES E A ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> .....	61
FIGURA 22 – AVALIAÇÃO DO PESO SECO DAS PLANTAS DE ARROZ INOCULADAS COM AS ESTIRPES MUTANTES E A ESTIRPE SELVAGEM DE <i>H. seropedicae</i> .....	62
FIGURA 23 – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE $\beta$ -GALACTOSIDASE, DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> , NA PRESENÇA DE EXTRATO DE CANA DE AÇÚCAR 5%.....	63
FIGURA 24 – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE $\beta$ -GALACTOSIDASE, DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> , NA PRESENÇA DE EXTRATO DE CANA DE AÇÚCAR 5% E NARINGENINA (50 $\mu$ mol/L).....	65
FIGURA 25 – CRESCIMENTO DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 E DAS ESTIRPES MUTANTES NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NARINGENINA.....	67
FIGURA 26 – EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE <i>H. seropedicae</i> NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE NARINGENINA.....	69

FIGURA 27 – GRÁFICO DE AMPLIFICAÇÃO DO cDNA 16S rRNA NAS AMOSTRAS CRESCIDAS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NARINGENINA.....	70
FIGURA 28 – GRÁFICOS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DOS cDNAs 16S rRNA, O-ANTIGENO ACETILASE E <i>ampG</i> DE <i>H. seropedicae</i> SmR1.....	72
FIGURA 29 – CURVA PADRÃO DOS cDNAs 16S rRNA, O-ANTIGENO ACETILASE E <i>ampG</i> .....	73
FIGURA 30 – CURVAS DE DISSOCIAÇÕES DOS cDNAs 16S rRNA, O-ANTIGENO ACETILASE E <i>ampG</i> .....	74
FIGURA 31 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES DE <i>H. seropedicae</i> NA PRESENÇA DE NARINGENINA.	76
FIGURA 32 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 DE <i>H. seropedicae</i> COM 2 mmol/L E 20 mmol/L DE NH <sub>4</sub> Cl .....	79
FIGURA 33 – EXTRAÇÃO RNA TOTAL E RNA DEPLETADO NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE NARINGENINA .....	81
FIGURA 34 - ANÁLISE DE REGRESSÃO DAS REPLICATAS DE RNA-Seq ....	83
FIGURA 35 - ANÁLISE DE REGRESSÃO ENTRE A AMOSTRA CONTROLE E AMOSTRA NARINGENINA.....	84
FIGURA 36 - CLASSIFICAÇÃO COG DOS GENES EXPRESSOS NA AMOSTRA CONTROLE E NARINGENINA .....	86
FIGURA 37 – DISTRIBUIÇÃO COG DO NÚMERO DE GENES EXPRESSOS NAS AMOSTRAS CONTROLE E NARINGENINA E NO GENOMA DE <i>H. seropedicae</i> .....	88
FIGURA 38 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE <i>H. seropedicae</i> REGULADOS POR NARINGENINA. ....	88
FIGURA 39 - CLASSES FUNCIONAIS DE GENES ATIVADOS NA PRESENÇA DE NARINGENINA .....	90
FIGURA 40 - CLASSES FUNCIONAIS DE GENES REPRIMIDOS NA PRESENÇA DE NARINGENINA	91

FIGURA 41 - NÍVEL DE ATIVAÇÃO DOS GENES <i>pca</i> NA PRESENÇA DE NARINGENINA.....	93
FIGURA 42 - PROVÁVEL INÍCIO DA VIA DE DEGRADAÇÃO DA NARINGENINA EM <i>H. seropedicae</i> .....	94
FIGURA 43 - ENVOLVIMENTO DOS GENES <i>pca</i> na VIA DE DEGRADAÇÃO DO PROTOCATEOCATO.....	95
FIGURA 44 - REGIÃO DO GENOMA DE <i>H. seropedicae</i> ONDE SE ENCONTRAM OS GENES QUE CODIFICAM PARA PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO FLAGELO	97
FIGURA 45 - REGIÃO DO GENOMA DE <i>H. seropedicae</i> ONDE SE ENCONTRAM OS GENES <i>mur</i> .....	99

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE <i>H. seropedicae</i> REGULADOS POR NARINGENINA.....	17
TABELA 02- PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DAS PLATAFORMAS 454 GS-FLX, ILLUMINA SOLEXA E SOLiD .....	20
TABELA03 - REPRESENTANTES DE BACTÉRIAS QUE POSSUEM TRANSCRIPTOMA ESTUDADO POR RNA-seq ATÉ O MOMENTO.....	22
TABELA 04 - Estirpes de Bactérias.....	24
TABELA 05 - ANTIBIÓTICOS.....	27
TABELA 06 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NO PCR EM TEMPO REAL.....	35
TABELA 07 - IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE <i>H. seropedicae</i> REGULADOS POR NARINGENINA.....	40
TABELA 08 - COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES DE <i>H. seropedicae</i> NA PRESENÇA DE NARINGENINA ATRAVÉS DE RT-PCR E ATIVIDADE ESPECÍFICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASE....	77
TABELA 09 - TEMPO DE GERAÇÃO DA ESTIRPE SELVAGEM EM DUAS CONCENTRAÇÕES DE $\text{NH}_4\text{Cl}$ .....	81
TABELA 10 - SEQUÊNCIAS OBTIDAS DAS BIBLIOTECAS TRANSCRIPTÔMICAS.....	82
TABELA 11 - COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES DE <i>H. seropedicae</i> NA PRESENÇA DE NARINGENINA ATRAVÉS DE TRASCRIPTOMA, PCR EM TEMPO REAL E ATIVIDADE ESPECÍFICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASE. ....	92



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfato  
AIA – ácido indolacético  
APS – persulfato de amônio  
ATP – adenosina trifosfato  
BSA – albumina de soro bovino  
COG – *Clusters of Orthologous Groups*  
DNA – ácido desoxiribonucleico  
dNTP –desoxinucleosídeos trifosfato  
D.O.<sub>n</sub> – densidade óptica a *n* nanômetros  
ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* ou enzima-imuno ensaio  
EPS – exopolissacarídeos  
EST – Expresses Sequence Tags  
kb – quilo pares de bases  
LPS - lipopolissacarídeos  
LRC- rachaduras das raízes laterais  
NAD – nicotinamida dinucleotídeo  
ONP – *o*-nitrofenol  
ONPG – *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo  
ORF – “*open reading frame*” ou sequência codificadora de proteína  
*p.* - probabilidade  
pb – pares de bases  
PG – peptídeoglicano  
RNA – ácido ribonucleico  
RPKM – reads per kilobase of transcript per million mapped reads  
rpm – rotações por minuto  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
SST3 – Sistema de secreção do tipo III  
t – tempo  
TEMED – N,N,N',N'-tetrametilenodiamina

TRIS – tris(hidroximetil)-aminometano

UFC – Unidade formadora de colônia

UV- ultravioleta

V – volume

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria diazotrófica e endofítica, encontrada associada ao milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cana de açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*), e também à algumas espécies tropicais como a bananeira (*Musa spp*) e o abacaxizeiro (*Ananas comosus*). O *H. seropedicae* é uma bactéria promotora do crescimento vegetal (PGPR-Plant Growth Promoter Rhizobacteria), sendo portanto utilizada como biofertilizante. Tadra-Sfeir (2008), construiu uma biblioteca de mutantes aleatórios da estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae*, que podem ser utilizados para determinar o padrão de expressão do gene mutado, em diferentes condições fisiológicas, devido a inserção do gene *lacZ* sem promotor. Cinco mil estirpes mutantes tiveram o seu padrão de expressão gênica testado na presença do flavonoide naringenina. Em vinte e duas estirpes mutantes a inserção do gene *lacZ* ocorreu em genes cuja expressão é regulada por naringenina. Dentre esses vinte e dois, foram encontrados genes que codificam para: proteínas envolvidas na biossíntese de exopolissacarídeos (EpsB) e lipopolissacarídeos (O-antígeno acetilase e aciltransferase); provável proteína membrana, glicosiltransferase e mucopeptídeo permease. Dezesesseis estirpes mutantes foram caracterizadas através da sua capacidade de formar biofilme e de colonizar epifiticamente e endofiticamente raízes de milho. O perfil eletroforético do LPS sintetizado pelas estirpes mutantes também foi analisado. O mutante MHS05, que possui mutação no gene *ampG*, apresentou perfil de LPS e estrutura do Lipídio-A diferente da estirpe selvagem SmR1 e também colonizou endofiticamente dez vezes menos raízes de milho do que a estirpe selvagem. Todos os genes com expressão diferencial na presença de naringenina foram validados por PCR em Tempo Real. Neste trabalho também foi utilizada a metodologia de seqüenciamento em larga escala (RNA-seq), utilizando o seqüenciador de nova geração SOLiD, para determinar o transcriptoma total de *H. seropedicae* na presença de naringenina. O RNA total foi extraído de células que cresceram na ausência (controle) e presença de naringenina (100 µmol/L). Sessenta e seis milhões de leituras da amostra controle e 61 milhões da amostra naringenina foram obtidas, e destes 50 milhões de leituras (controle) e 47 milhões de leituras (naringenina) foram mapeados com o genoma de referência de *H. seropedicae* SmR1. As análises dos dados mostraram que 336 genes são regulados por naringenina, sendo 150 genes induzidos e 186 reprimidos pela presença do flavonóide. Dentre esses identificamos genes envolvidos no metabolismo de compostos aromáticos, como os genes *pcaFJI*, que são fortemente induzidos pela presença do flavonóide indicando que estes podem estar envolvidos com a degradação de naringenina em *H. seropedicae*.

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* is a diazotrophic bacterium found in endophytic association with maize (*Zea mays*), rice (*Oriza sativa*), sorghum (*Sorghum bicolor*), sugar cane (*Saccharum officiarum*) and some tropical species like banana (*Musa sp*) and pineapple (*Ananas comosus*). The *H. seropedicae* is a plant growth promoter bacteria (PGPR – Plant Growth Promoter Rhizobacteria) and can be used as biofertilizer. Tadra-Sfeir (2008) constructed a mutant strains library using the SmR1 strain of *H. seropedicae*. These mutant strains can be used to determine the pattern of the mutated gene in differential physiological conditions due to insertion of *lacZ* gene without promoter region. Five thousand mutant strains were screened for differential expression in the presence or absence of naringenin. In twenty two strains the insertion of *lacZ* gene was found in genes that responded to naringenin. Among these twenty two strains found genes that code to: protein involved in exopolysaccharides biosynthesis (EpsB), lipopolysaccharides (O-antigen acetylase and acyltransferase), putative membrane protein, glycosyltransferase, and muropeptide permease (AmpG). Sixteen mutant strains were analysed by biofilm formation and epiphytic and endophytic colonization in maize roots. The mutant strains LPS profile was also analyzed. One mutant MHS05 (mutated gene codes a muropeptide permease (*ampG*)), presented the LPS profile and the fine structure of Lipid A different from the wild-type strain SmR1 and this same mutant colonize endophytically maize roots ten times less than the wild type. All the genes with differential expression in the presence of naringenin were validated by real time PCR. We also used a high-throughput sequencing based method (RNA-Seq) using the next-generation sequencer SOLiD to analyse the influence of naringenin on the whole transcriptome profile of *H. seropedicae*. Total RNA was extracted from cells grown in the absence (control) and presence of naringenin (100 µmol/L). A total of 66 million reads of the control sample and 61 million of the test sample were obtained and out of these 50 million and 47 million in the control and test sample were mapped to the bacteria. Data analysis demonstrated that 336 genes are regulated by naringenin, 150 genes are induced and 186 are repressed. Genes involved in aromatic metabolism such as *pcaFII* are strongly induced, indicate that these genes can be involved in naringenin degradation in *H. seropedicae*.

# 1.INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos nas plantas é inevitável, sendo que estes podem interagir de forma variável. Muitos microrganismos são fitopatógenos sendo que estes resultam em prejuízo para o tecido vegetal. Por outro lado existem diversos grupos de bactérias associativas que trazem diversos benefícios as plantas, como é o caso das bactérias fixadoras de nitrogênio. As plantas não conseguem utilizar o nitrogênio atmosférico, por isso necessitam de bactérias fixadoras de nitrogênio, que o convertem em uma forma assimilável: a amônia. As bactérias fixadoras de nitrogênio estabelecem simbiose com plantas superiores, nas quais a energia para a fixação de nitrogênio e proteção para estas são fornecidas pela planta.

Existem dois grandes grupos de bactérias que fazem interação com a planta. Há as bactérias formadoras de nódulos e as bactérias endofíticas. As bactérias formadoras de nódulos (Rhizobiaceae), são bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* e outros gêneros, e os microrganismos endofíticos passam a maior parte do seu ciclo de vida dentro de tecidos de plantas e é caso da associação gramínea-*Herbaspirillum*/*Azospirillum*.

O processo de nodulação, nas bactérias dos gêneros *Rhizobium*, é controlado, em grande parte, pela troca de sinais entre a bactéria simbiote e a planta hospedeira. Além dos fatores Nod outros determinantes influenciam na simbiose como é o caso do sistemas de secreção do Tipo III e a biosíntese de lipopolissacarídeos e exopolissacarídeos. A expressão de todos estes genes bacterianos responsáveis é induzida por flavonóides excretados pelas raízes das plantas.

O processo de colonização por *H. seropedicae* ocorre através da ligação da bactéria à superfície da planta. A entrada da bactéria ocorre nos pontos de emergência de raízes secundárias e ferimentos, e a disseminação ocorre através dos espaços intercelulares com posterior ocupação do xilema. A associação *Herbaspirillum*/planta pode trazer muitos benefícios mas o genes responsáveis por esta interação ainda não são conhecidos.

Tadra-Sfeir 2008, utilizando estratégia de mutagênese aleatório encontrou genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo flavonóide naringenina, e alguns destes genes estão relacionados a biosíntese de LPS e EPS e ainda são importantes na estrutura e composição da membrana bacteriana. A caracterização funcional destes genes através de ensaios com plantas e outros ensaios fisiológicos, como verificação da formação de biofilme, análise do perfil de LPS e de membrana interna e externa podem permitir a elucidação de qual a função destes genes no organismo de estudo e verificar se eles estão envolvidos na interação planta/*Herbaspirillum*.

Estudos que utilizam estratégias de mutagênese aleatória têm demonstrado grande eficiência na identificação de genes e elucidação de suas funções e a grande vantagem deste procedimento é que além de revelar o perfil de expressão do gene alvo ele permite a realização subsequente de análises fisiológicas através de ensaios que envolvem as estirpes mutantes. Um limitante desta metodologia é que ela pode ter uma probabilidade menor de capturar genes essenciais e que se auto-regulam, mas isto pode ser contornado utilizando-se de novas tecnologias em que se poderia ver a resposta gênica global. Um exemplo seria através de ensaios de transcriptoma como microarranjo, ESTs (Expressed Sequence Tags) ou ainda RNA-seq.

O estudo do transcriptoma de cada organismo é de grande importância para a identificação de genes, mas também incorpora informações sobre o funcionamento do seu genoma. Este trabalho representa uma primeira etapa na identificação de genes do microrganismo *Herbaspirillum seropedicae* expressos na presença do flavonóide naringenina através de dados obtidos por RNA-seq.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Herbaspirillum seropedicae*

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria diazotrófica endofítica, gram-negativa, vibrióide, membro da classe  $\beta$  das Proteobactérias (BALDANI et al., 1986). Esta bactéria foi encontrada associada ao milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cana de açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*) e em espécies tropicais como a bananeira (*Musa spp.*) e abacaxizeiro (*Ananas comosus*) (BALDANI et al., 1986; PIMENTEL et al., 1991; CRUZ et al., 2001).

O início da associação entre arroz e *H. seropedicae* ocorre através da adesão da bactéria à superfície das raízes, seguida de proliferação, preferencialmente nas raízes secundárias e ferimentos da epiderme, penetração e espalhamento da bactéria através dos espaços intercelulares e feixes vasculares das partes aéreas com subsequente colonização e estabelecimento nos vasos do xilema (JAMES et al., 1997).

Esta associação *Herbaspirillum*-planta pode trazer mútuos benefícios. Baldani e colaboradores (1995) inocularam diferentes estirpes de *Herbaspirillum spp.* em sementes de arroz e observaram que a estirpe Z94 contribui com até 54% do nitrogênio total acumulado pela planta; as outras estirpes também contribuíram com aproximadamente 30% do nitrogênio. O uso de estirpes de *H. seropedicae* imuno-marcadas e com genes repórter revelou que este expressa os genes *nif* ao colonizar raízes e partes aéreas de arroz, indicando que este endófito é capaz de fixar nitrogênio *in planta* (JAMES et al., 2002; RONCATO-MACCARI et al., 2003).

Ao contrário dos organismos diazotróficos que habitam a rizosfera e que necessitam competir com a microflora do solo por fontes de carbono, os organismos diazotróficos endofíticos, como *H. seropedicae*, podem ser encontrados no interior dos tecidos das plantas, ambientes mais uniformes e protegidos. (URQUIAGA et al., 1992; BALDANI et al., 1996).

A associação *H. seropedicae* - gramínea em geral não causa prejuízos às plantas hospedeiras; pelo contrário, promove o crescimento vegetal, através da capacidade de produzir compostos que podem estimular o desenvolvimento das plantas pela produção de fitohormônios (BASTIÁN et al., 1998).

## 2.2 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

O processo de interação planta-bactéria pode ser dividido em três classes: simbiótica, fitopatogênica e associativa (PÜHLER et al., 2004). A interação simbiótica caracteriza-se pelo favorecimento mútuo entre as duas partes e pela formação dos nódulos radiculares. Nesse caso, o resultado é que o microsimbionte é capaz de fixar o nitrogênio atmosférico, que pode ser utilizado pelo macrosimbionte, em troca de proteção e nutrientes. Na interação simbiótica encontramos as bactérias formadoras de nódulos (Rhizobiaceae), que são bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradirhizobium* e *Azorhizobium*, entre outros, e são capazes de se associarem em simbiose altamente organizada com a planta hospedeira (PÜHLER et al., 2004). Estas bactérias comumente referidas como rizóbios são capazes de associar-se simbioticamente com espécies leguminosas, formando estruturas especializadas, os nódulos radiculares. Este processo de nodulação é controlado, em grande parte, pela troca de sinais entre a bactéria simbionte e a planta hospedeira (MERCANTE et al., 2002).

As bactérias fitopatogênicas utilizam uma gama de estratégias para a invasão e a colonização do hospedeiro, elas desenvolveram um método específico de ataque nas células hospedeiras e utilizam as substâncias das plantas para seu próprio crescimento (PÜHLER et al., 2004). Estudos bioquímicos, genéticos e celulares destes fitopatógenos demonstraram que os mecanismos utilizados envolvem fatores como adesinas, pili, fatores de sinalização bacteriana, fatores de transcrição especializados como fatores sigma alternativos, receptores de fatores externos ou derivados de plantas, proteínas envolvidas em transdução de sinais, e proteínas que constituem ou regulam sistemas de secreção de macromoléculas e



fatores de patogenicidade (HUECK, 1998; ALDON et al., 2000; BRITO et al., 2002; FRANCIS, WOLF-WATZ & FORSBERG, 2002).

Nas interações associativas, há um aproveitamento maior por parte do microrganismo. A bactéria pode viver no exudato, ou mesmo no interior da planta e, como recompensa por exemplo, protege a planta suprimindo patógenos ou estimulando o crescimento da planta através de produção de substâncias específicas (PÜHLER et al., 2004).

Na interação associativa o evento chave parece ser a colonização da rizosfera (PÜHLER et al., 2004). Dentre os estágios deste processo estão a percepção da planta, a quimiotaxia em direção à raiz e a aderência e colonização da superfície da raiz.

Dentro da interação associativa encontramos os microrganismos endofíticos que passam a maior parte do seu ciclo de vida dentro de tecidos de plantas, porém não causam, aparentemente, nenhum dano a estas (QUISPEL, 1992). Segundo Hallmann e colaboradores (1997) bactérias endofíticas são aquelas que podem ser isoladas da superfície desinfetada do tecido vegetal ou extraídas do interior da planta, mas não causam danos visíveis à planta hospedeira. Bactérias dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus* são denominadas de diazotrófica endofíticas pois são capazes de fixar nitrogênio e colonizar os tecidos internos das plantas (BALDANI et al., 1986; BODDEY et al., 1995).

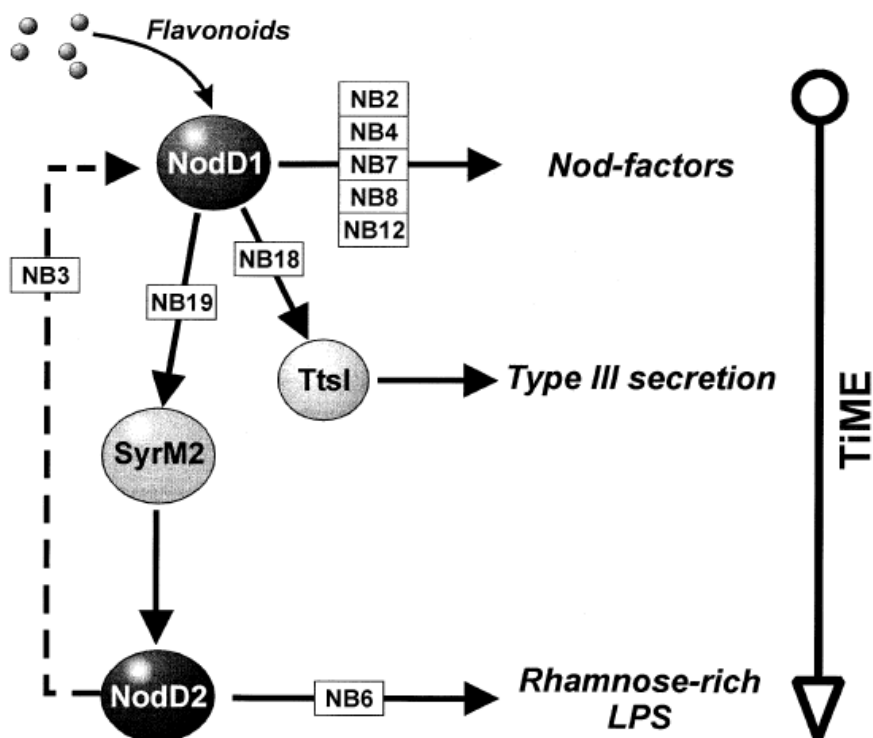
A associação de bactérias diazotróficas endofíticas com raízes de plantas não resulta na formação de estruturas vegetais facilmente detectáveis. Por causa desta falta de um fenótipo claro, devido principalmente à dispersão da bactéria por todo o corpo da planta, os mecanismos de interação e estimulação de crescimento vegetal por estas bactérias são pouco conhecidos.

Qualquer que seja o tipo da interação planta-bactéria, o crescimento competitivo e a sobrevivência do microrganismo em diversas partes do hospedeiro necessitam de respostas adaptativas por parte da bactéria. Esta e outras pressões seletivas parecem ter direcionado a evolução de sistemas especializados de

regulação que controlam a expressão de fatores de colonização e virulência (MILLER, MEKALANOS & FALKOW, 1989).

Diversos estudos têm demonstrado que alguns mecanismos e sistemas são comuns no processo de interação de diversas bactérias com plantas. Em *Rhizobium* NGR234 foi proposto uma cascata de ativação de genes que são ativados na interação deste com plantas (Figura 01). Primeiramente ocorre a percepção de um sinal liberado pela planta, neste caso flavonóides, que então interagem com a proteína NodD de *Rhizobium* e esta por sua vez ativa os genes *nod*, responsáveis pelo processo de nodulação. Também são ativados, neste momento, genes responsáveis pelo Sistema de Secreção do Tipo III e genes relacionados com a síntese de polissacarídeos de membrana como os lipopolissacarídeos (LPS) (KOBAYASHI et al., 2004). Todos estes genes responsáveis pela interação de *Rhizobium* NGR234 já foram descritos e encontrados em outros organismos.

**FIGURA 01 - MODELO PROPOSTO PARA CASCATA REGULATÓRIA DEPENDENTE DE FLAVONÓIDE-NODD1 EM *Rhizobium* NGR234**



Neste modelo flavonóides interagem com a proteína NodD1 e desencadeiam uma cascata regulatória de ativação seqüencial. Nesta cascata são ativados os fatores nod, o Sistema de Secreção do Tipo III e genes responsáveis pela síntese de LPS. Nas caixas em branco estão demonstrados os promotores que vão sendo ativados. Fonte: KOBAYASHI et al., 2004.

### 2.2.1 Flavonóides

Raízes de plantas exsudam uma enorme variedade de pequenas moléculas que atuam na interação das plantas com a rizosfera. Alguns dos compostos que atuam nesta interação são os flavonóides (BAIS et al., 2006).

Os flavonóides são pigmentos hidrossolúveis compondo o maior grupo de compostos fenólicos vegetais. Mais de 4.000 diferentes flavonóides foram encontrados exsudados tanto da parte aérea quanto das raízes e provavelmente são os metabólitos secundários das plantas mais bem estudados (HUNGRIA, 1994; LEPINIEC et al., 2006).

Os flavonóides são produtos da via biossintética de fenilpropanóides sintetizados a partir de fenilalanina e malonil-CoA. O primeiro passo da via dos flavonóides, catalisado pela chalcona sintase (CHS), é a síntese de um derivado de chalcona, 4,2',4',6-tetrahidroxichalcona e a partir deste derivado é que serão obtidos diferentes flavonóides (Figura 02) (REDDY et al., 2007).

Estruturalmente, flavonóides são compostos poliaromáticos com um esqueleto básico de 15 carbonos, que são arranjados em três anéis denominados A, B e C (Figura 03). Os flavonóides diferem entre si de acordo com o tipo de ligação nos anéis, posição e natureza dos substituintes (hidroxil, metil, glicosil) (LEPINIEC et al., 2006; SHAW, MORRIS & HOOKER, 2006; REDDY et al., 2007). Devido a essas variações na estrutura os flavonóides podem ser divididos em várias classes, as cinco classes principais estão sendo mostradas na Figura 04 (AGUIAR et al., 2007).

## FIGURA 02 – VIA DE SÍNTESE DE FENILPROPANÓIDES

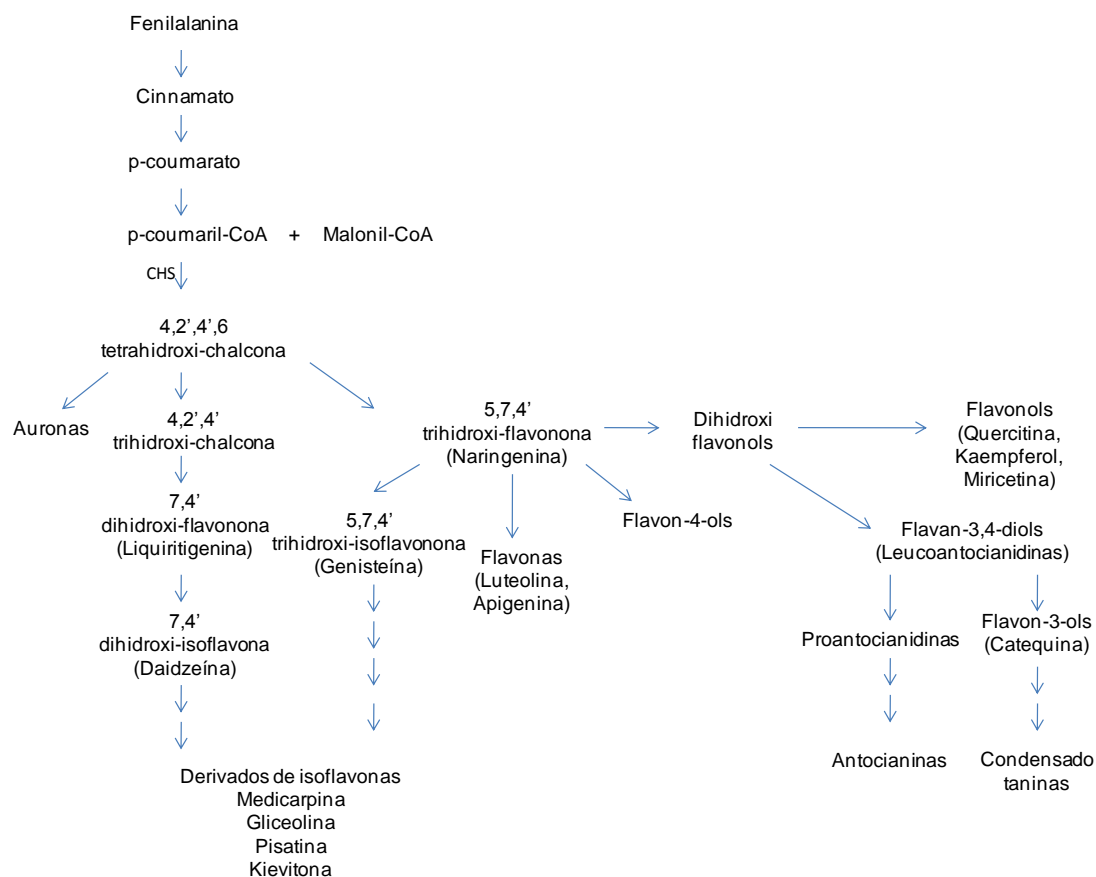
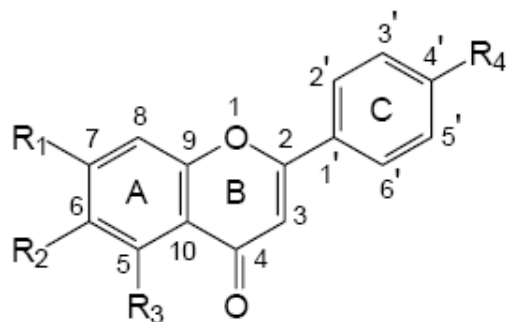


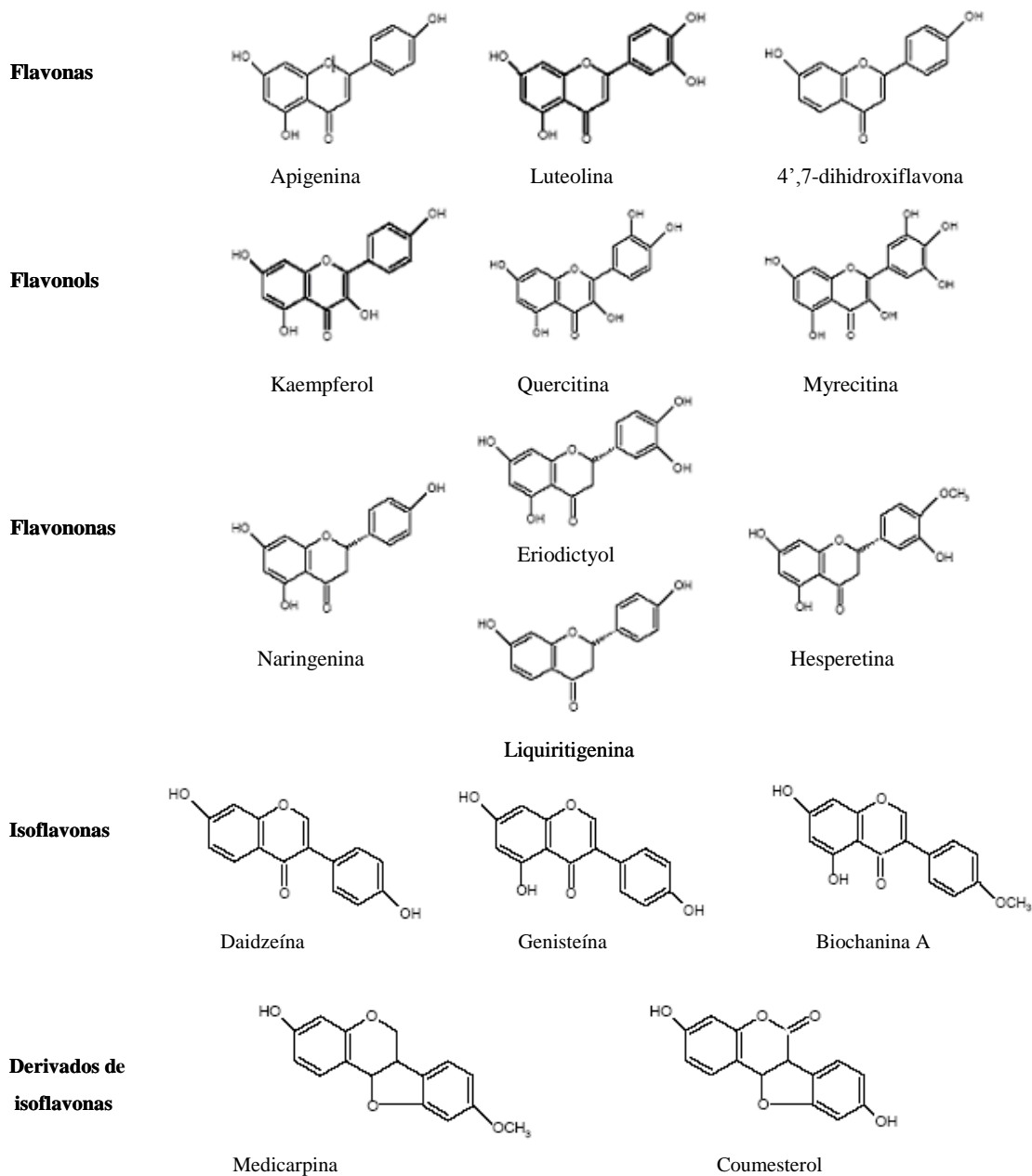
Diagrama parcial da via de síntese de fenilpropanóides mostrando os intermediários na biossíntese dos flavonóides. Fonte: Adaptado de REDDY et al., 2007.

## FIGURA 03 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES



Estrutura básica dos flavonóides, representando os três anéis e as regiões onde se encontram os substituintes. Fonte: AGUIAR et al., 2007.

## FIGURA 04 – CLASSES DE FLAVONÓIDES



Estrutura representativa das principais classes de flavonóides: flavononas, isoflavonas, flavonas, flavonols e derivados de isoflavonas. Fonte: Adaptado de REDDY e colaboradores, 2007.

Os flavonóides podem ter diversas funções como proteger as células das folhas contra injúrias foto-oxidativas, durante a reação de fotossíntese, proteger as folhas contra a radiação UV, estar envolvidos com o desenvolvimento e reprodução das plantas, e também podem agir como substâncias quimiotáticas que são reconhecidas por polinizadores e microrganismos (HUNGRIA, 1994; HAVSTEEN, 2002; LEPINIEC et al., 2006; REDDY et al., 2007).

Outra função importante dos flavonóides é que eles afetam o modo como as plantas interagem com outros organismos. Os flavonóides liberados de raízes de leguminosas podem estimular ou inibir respostas genéticas específicas nas diferentes bactérias a ela associadas (SHAW, MORRIS & HOOKER, 2006).

Espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* associam-se em simbiose altamente organizada com a planta hospedeira. Esta associação é hospedeiro-específica (SMITH, 1992; VERMA et al., 1992) e a maioria dos hospedeiros são plantas leguminosas (*Fabaceae*) (BOTTMLEY, 1992; YOUNG & JOHNSTON, 1989). A interação entre rizóbios e leguminosas inicia com troca de sinais e reconhecimento do simbionte, seguido de adesão do microrganismo aos pêlos radiculares da planta. Os pêlos da raiz sofrem uma deformação e a bactéria invade a planta (MYLONA et al., 1995). Neste processo simbiótico, estruturalmente complexo, a planta elabora uma nova estrutura morfogênica denominada nódulo. O desenvolvimento do nódulo consiste em vários estágios determinados pela ação de produtos de conjuntos de genes da planta hospedeira e da bactéria simbionte (SCHLOTTER et al., 1997).

Alguns estudos mostram que flavonóides como naringenina e daidzeína estimulam a colonização, em *Arabidopsis thaliana*, através das rachaduras das raízes laterais (LRC) por *H. seropedicae* (GOUGH et al., 1997).

### 2.2.1.1 Sistema de Secreção do Tipo III

O sistema de secreção Tipo III (SST3) foi primeiramente identificado em bactérias patogênicas de plantas e animais posteriormente, foi também encontrado em organismos associativos como *Pseudomonas fluorescens* (MARIE et al., 2001; PÜHLER et al., 2004).

O SST3 em geral é formado por uma estrutura cilíndrica chamada de complexo da agulha, semelhante ao corpo basal flagelar, composto por dois pares de anéis que abrangem a membrana bacteriana interna e externa. Dependendo da família de injetossomas uma estrutura de agulha, um filamento, ou um *pilus*, terminam a estrutura (CORNELIS, 2006). A principal diferença entre a agulha, o filamento e o *pilus* é o seu comprimento, sendo que em fitopatógenos o *pilus* é mais comprido, uma vez que os fitopatógenos precisam atravessar a resistente parede celular das células vegetais. Uma das proteínas conservadas do SST3 é uma ATPase, e a integridade desta proteína é essencial para o funcionamento do sistema, uma vez que ela energiza o processo de secreção de proteínas. A ATPase de *P. syringae* forma hexâmeros e dodecâmeros que são ativados por oligomerização e estão perifericamente associados com a parte citoplasmática da membrana interna (POZIDIS et al., 2003).

Os genes *hrp/hrc* codificam proteínas que formam o sistema de secreção do tipo III (SST3), este sistema é responsável pela transferência de proteínas através da membrana bacteriana e da membrana plasmática eucariótica das células hospedeiras (BUTTNER & BONAS 2002). O sistema HRP injeta proteínas estrategicamente nas células hospedeiras sem causar nenhum processo proteolítico. As proteínas secretadas por esse sistema têm como função regular a secreção de outras proteínas, facilitar a translocação das proteínas secretadas nas células hospedeiras e alterar diretamente as funções e estruturas das células hospedeiras (GREENBERG & VINATZER, 2003). As proteínas secretadas podem estar envolvidas com a colonização, crescimento patogênico e exploração da planta (LONG & STASKAWICZ, 1993).



Em *Rhizobium* NGR234 a expressão do sistema de secreção do Tipo III é ativado pela proteína NodD que responde a flavonóides. Os genes do TTSSs são expressos no estágio intermediário da simbiose, depois dos genes *nod*, mas antes dos genes *fix* e *nif* (estes últimos responsáveis pela fixação de nitrogênio). Isto indica que os genes TTSS não são requeridos para a fixação de nitrogênio, mas sim para a infecção pela bactéria (VIPREY et al., 1998).

#### **2.2.1.2 Lipopolissacarídeos e Exopolissacarídeos**

Polissacarídeos da superfície celular de algumas espécies de rizóbios podem estar envolvidos no início da infecção, formação do nódulo e especificidade hospedeira. Duas categorias têm sido estudadas: os exopolissacarídeos (EPS) e os lipopolissacarídeos (LPS). O termo exopolissacarídeo (EPS) é amplamente utilizado para nomear polímeros de carboidratos encontrados no exterior das células, sendo sua estrutura altamente diversificada, com propriedades físicas e composições químicas extremamente variadas (SUTHERLAND, 1980). Talvez a principal função dos exopolissacarídeos na fisiologia microbiana seja a de promover a adesão das células formando agregados (COSTERTON et al., 1995)

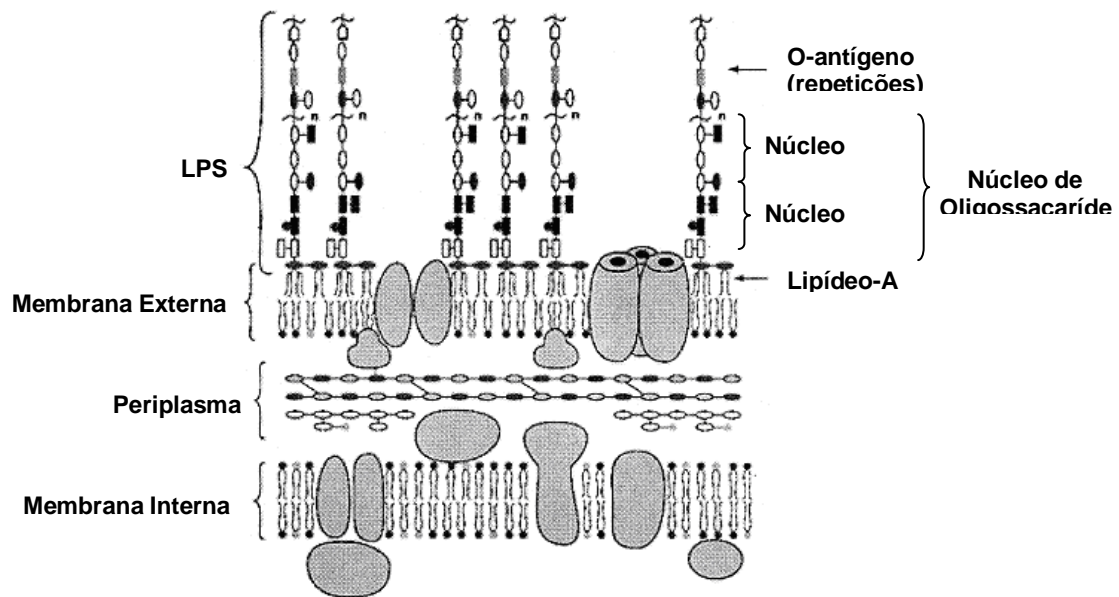
Os lipopolissacarídeos (LPS) são os principais constituintes do envoltório de bactérias gram-negativas e são constituídos por três regiões: lipídeo A, núcleo de oligossacarídeos e polissacarídeo O (antígeno O) (Figura 05). O lipídeo A contém uma região hidrofóbica ancorada à membrana e é o componente bioativo, responsável por algumas fisiopatologias associadas com infecção severa por gram-negativos em humanos e outros animais. O núcleo de oligossacarídeos consiste de uma pequena cadeia de açúcares que conecta o lipídeo A ao antígeno O, e pode ser dividido em região externa e interna. O antígeno O conecta o LPS com o ambiente. A cadeia de antígeno O pode variar no comprimento, contendo até 40 unidades repetitivas, e na constituição de açúcares. A variação estrutural dos antígenos O contribui para a variedade de espécies e até mesmo estirpes de bactérias gram-negativas (LEROUGE & VANDERLEIDEN, 2001).

A correta estrutura de LPS é essencial para o estabelecimento da interação hospedeiro/bactéria, da infecção em patógenos ou benefícios mútuos em simbioses. A expressão de genes que regulam a variação estrutural do O-antígeno pode ser modulada em respostas a sinais enviados pelo hospedeiro, como é o caso dos flavonóides. Flavonóides, como apigenina, são capazes de regular a via de síntese de ramnose constituinte do LPS de *Rhizobium* NGR234 (LEROUGE & VANDERLEIDEN, 2001; BROUGHTON et al., 2006).

Algumas modificações na estrutura de LPS ou EPS podem fazer com que a bactéria tenha dificuldade para invadir a planta hospedeira (BROUGHTON et al., 2006; LONG & STASKAWICZ, 1993).

Estas moléculas complexas participam dos estágios iniciais de colonização, uma vez que compõem a estrutura que realiza o primeiro contato com o hospedeiro. Mutações nos genes envolvidos com a síntese destes compostos, *exo* (EPS) e *lps* (LPS) podem afetar o processo de infecção de várias maneiras, como, por exemplo, impedindo a formação dos cordões de infecção e resultando na formação de nódulos vazios (ARNOLD et al., 1994, *apud* MERCANTE et al., 2002).

**FIGURA 05 – REPRESENTAÇÃO MOLECULAR DO ENVELOPE CELULAR DE BACTÉRIA GRAM-NEGATIVAS.**



Estrutura do envelope celular de bactérias Gram-negativas. O LPS é constituído por O-antígeno, núcleo de oligossacarídeo e o lipídeo-A. Fonte: Adaptado de LEROUGE & VANDERLEYDEN, 2001).

## 2.3 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

Os microrganismos têm a capacidade de se adaptar rapidamente a mudanças no ambiente, e os que não mostram tal característica podem ser eliminados. O fundamento para a sobrevivência bacteriana em condições de ambiente variáveis é a sua capacidade de se adaptar a diferentes situações relacionadas com as mudanças de expressão de um determinado conjunto de genes (JAIN et al., 2006).

Estudos recentes mostraram que a estratégia de mutagênese aleatória foi muito eficiente na identificação de genes e elucidação de suas funções (DENNIS & ZYLSTRA, 1998). A metodologia de mutagênese aleatória utilizando transposon com gene repórter sem promotor tem sido amplamente utilizada para determinar padrões de expressão diferencial de genes em bactérias.

Schwab e colaboradores (2007) utilizando a metodologia de mutagênese aleatória utilizando transposon com gene repórter sem promotor identificaram 26 genes de *H. seropedicae* Z78 com expressão diferencial na presença de duas concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mmol/L e 2 mmol/L). O procedimento permitiu a identificação de vinte e seis genes distintos da bactéria endofítica fixadora de nitrogênio regulada de acordo com os níveis de amônio.

Tadra-Sfeir (2008), após a análise de uma biblioteca de mutantes aleatórios de *H. seropedicae* SmR1, utilizando a mesma estratégia de mutagênese aleatória, encontrou vinte e dois genes que respondem ao flavonóide naringenina e identificou doze destes genes (Tabela 01). É importante ressaltar que seis dos genes identificados estão relacionados com composição e estrutura do envelope celular. Foram encontrados genes relacionados a LPS (O-antígeno acetilases), EPS e ainda composição da membrana (proteína de membrana). Como essas moléculas podem estar envolvidas no primeiro contato entre a bactéria e a célula hospedeira é importante a caracterização funcional destes genes para observação se estes estão envolvidos na interação *H. seropedicae*-planta, um mecanismo que ainda é pouco conhecido.

**TABELA 01 - IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE *H. seropedicae* REGULADOS POR NARINGENINA**

Estirpe Mutante	Nome do gene	Produto ou Função do gene
9B3 (MHS01)	<i>epsG</i>	Biossíntese de eps
9D4 (MHS02)	<i>Hsero_2207</i>	O-antígeno acetilase
9E3 (MHS03)	<i>Hsero_0499</i>	Proteína hipotética conservada
9F3 (MHS04)	<i>Hsero_0981</i>	O-antígeno acetilase
13C9 (MHS07)	<i>trmU</i>	Metiltransferase
31B12 MHS08)	<i>Hsero_3478</i>	Proteína hipotética
37A5 (MHS09)	<i>bioF</i>	Ácido5-aminelevulinico sintase
37C5 (MHS10)	<i>Hsero_3479</i>	Proteína hipotética
39G2 (MHS12)	<i>Hsero_2254</i>	NAD dependente
T1A8 (MHS14)	<i>Hsero_4278</i>	Indolpiruvato ferredoxina oxirredutase, subunidades $\alpha$ e $\beta$
T1E11 (MHS15)	<i>gumH</i>	Proteína hipotética
T2B10 MHS16)	<i>Hsero_1816</i>	Proteína hipotética conservada não caracterizada

Estirpes mutantes identificadas e números das ORFs identificadas no genoma de *H. seropedicae* com nome dos genes e seus respectivos produto ou função.  
Fonte: Tadra-Sfeir, 2008.

### **2.3.1 Transcriptoma de bactérias por RNA-seq**

O transcriptoma compreende o conjunto completo dos transcritos de um organismo em um determinado estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica. Compreensão do transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os componentes moleculares de células e tecidos (WANG, GERSTEIN & SNYDER, 2009). O estudo do transcriptoma é uma poderosa ferramenta para se entender a estrutura gênica e a regulação RNA-dependente de qualquer organismo (SOREK & COSSART, 2010).

Várias tecnologias foram desenvolvidas para elucidar e quantificar o transcriptoma, incluindo abordagens de hibridação em microarranjo (microarrays), ESTs e sequenciamento em grande escala (RNA-seq) (WANG, GERSTEIN & SNYDER, 2009). A tecnologia de hibridação que até o momento é considerada de grande escala, possui algumas limitações como o alto índice de ruído devido à hibridação cruzada ocorrendo limitações na faixa de detecção e incapacidade de detectar transcritos com baixo número de cópias. Além disso, comparações de dados de expressão de diferentes experimentos são difíceis e exigem um método complicado de normalização com base em complexos cálculos estatísticos (PINTO et al., 2011).

O termo RNA-seq tem sido utilizado para representar o transcriptoma revelado por seqüenciamento de cDNA e este sistema proporciona aos pesquisadores um método revolucionário que possui alta sensibilidade e pode ser utilizado para caracterizar o transcriptoma de um organismo. Ele é útil para descobrir novas transcrições, identificações de mutações, deleções e inserções, splicings alternativos e ainda oferece uma cobertura elevada. Entre suas maiores vantagens é que não há quase nenhum ruído e ainda permite o mapeamento inequívoco das sequencias em uma única região do genoma, sendo capaz de detectar numerosas cópias de mRNA por célula (PINTO et al., 2011).

Os sequenciamentos de nova-geração (RNA-seq) são produzidos a partir de bibliotecas de fragmentos que não estão sujeitas à amplificação baseada em vetor de clonagem e sequenciamento utilizando eletroforese capilar, minimizando os

erros e simplificando a preparação das amostras. RNA-Seq tem se mostrado altamente preciso na quantificação dos níveis de transcrição com resultados semelhantes aos fornecidos pelo PCR quantitativo (van VLIET, 2009; WANG, GERSTEIN & SNYDER, 2009; PINTO et al., 2011). No RNA-seq, uma população de RNAs celulares é convertida em cDNA e submetida a sequenciamento de alta produtividade. As sequências são mapeadas contra algum genoma para gerar um mapa transcriptômico, refletindo um determinado estado celular (MARDIS, 2008).

Atualmente existem três principais sistemas de sequenciamento de nova-geração de alta produtividade: GS FLX Genome Analyzer (Roche-454), Illumina Solexa 1G sequencer e SOLiD system (AppliedBiosystems) (van VLIET, 2009). Todas as plataformas podem ser utilizadas no sequenciamento de transcriptoma bacteriano sendo que cada uma possui vantagens e desvantagens (Tabela 2). As plataformas 454<sup>®</sup> e SOLiD<sup>®</sup> têm como diferencial a utilização de uma reação de PCR em emulsão. Essa reação permite a amplificação de moléculas únicas de DNA dentro de micro-reatores em emulsão.

A plataforma 454<sup>®</sup> possui como característica mais forte a geração de sequências longas e sua alta velocidade do sequenciamento. Suas desvantagens estão na menor quantidade de dados gerados. A tecnologia Illumina Solexa GA<sup>®</sup> é baseada na ligação do adaptador, seguido pela ancoragem e amplificação por PCR *in situ*, as sequências obtidas possuem de 75-100 nucleotídeos e uma das grandes vantagens da técnica são as grandes quantidades de dados gerados, mas sua precisão é relativamente baixa e as imagens requerem muito espaço de armazenamento. Finalmente, a tecnologia do sistema SOLiD<sup>®</sup> gera e lê fragmentos de 35—50 nucleotídeos e sua grande vantagem é a alta fidelidade das sequências obtidas, o que torna a tecnologia perfeitamente adequada para a análise de SNPs, e a ainda gera uma grande quantidade de conjunto de dados. As desvantagens são semelhantes a tecnologia Illumina<sup>®</sup> (Tabela 2) (van VLIET, 2009, METZKER, 2010; CARVALHO & SILVA, 2010).

**TABELA 02- PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DAS PLATAFORMAS 454 GS-FLX, ILLUMINA SOLEXA E SOLiD**

Plataforma	Informação (Gb)	Reads	Duração da Corrida (dias)	Acurácia
GS FLX 454 <i>Titanium</i>	0,5	400 pb	0,35	99,5%
Illumina Solexa	18-35	75-100	4	98,5%
SOLiD System	30-50	35-50	7-14	99%

Resumo das principais características técnicas das plataformas 454 GS-FLX, Illumina Solexa e SOLiD. A duração da corrida inclui o tempo para o preparo, a leitura e o processamento das amostras. Fonte: Adaptado de: METZKER, 2010; CARVALHO E SILVA, 2010.

Trabalhos têm utilizado o uso de sequenciamento de nova geração para visualizar a forma e complexidade dos transcriptomas bacterianos. Embora o estudo pioneiro foi feito com organismos eucarióticos, porque os seus mRNAs com caudas poli-A são mais fáceis de isolar, a tecnologia de RNA –seq tem sido amplamente aplicada em bactérias. Diversos trabalhos têm demonstrado serem úteis para o entendimento da fisiologia bacteriana e ainda melhorar o entendimento e refinamento da estrutura genômica permitindo uma melhor qualidade da anotação (Tabela 03) (PINTO et al., 2011).

A primeira visão completa e resolução de um transcriptoma bacteriano feito pelo sistema SOLiD® foi o de *Bacillus anthracis* em diversas fases de crescimento em duas condições ambientais. Neste trabalho os dados forneceram um mapa preciso e de alta resolução dos locais de início de transcrição, da estrutura de operons assim como estrutura de todo genoma. Além disso permitiram aumentar a precisão da anotação do genoma já existente e fornecer estimativas de abundância de transcrição. No geral eles conseguiram demonstrar uma visão inédita da expressão gênica e regulação de uma célula bacteriana utilizando sequencias curtas de 35 nucleotídeos, mapeando cerca de 39 milhões de sequencias (PASSALACQUA et al., 2009).

Yoder-Himes e colaboradores (2009), trabalhando com duas cepas da bactéria *Burkholderia cenocepacia*, obtiveram resultados interessantes utilizando Illumina,



o número de leituras variou entre 1,7 e 4,5 milhões por amostra e comparando-se isolados de dois nichos distintos (um de solo e outro de paciente com fibrose cística) foi observado um grande número de diferenças na regulação das duas cepas.

Oliver et al. (2009) mostrou que a metodologia de RNA-seq pode caracterizar quantitativamente o transcriptoma de procariotos com precisão, proporcionando novos meios de explorar a regulação da transcrição de bactérias. Eles utilizaram a tecnologia Illumina para caracterizar o transcriptoma de *Listeria monocytogenes* 10403S na fase estacionária e de uma estirpe mutante, que está envolvida na resposta a estresse. Eles descobriram que 83% dos genes são transcritos na fase estacionária e que 42% dos genes anotados no genoma possui um nível moderado ou alto de transcrição. Noventa e seis genes tinham níveis significativamente altos de transcrição em comparação com a estirpe mutante.

Isabella e Clark (2011) detectaram um grande número de genes diferencialmente expressos no genoma de *Neisseria gonorrhoeae* quando cultivada em um ambiente anaeróbico. Utilizando a tecnologia SOLiD eles obtiveram cerca de 1,5 milhões de sequências e os dados revelaram reguladores transcricionais envolvidos no crescimento anaeróbico.

O transcriptoma total da bactéria *Staphylococcus aureus* foi demonstrado por RNA-seq, utilizando Illumina. Quatro pontos da curva de crescimento foram analisados, com a finalidade de definir a expressão temporal da transcrição. RNAs totais foram extraídos utilizando dois métodos diferentes e posteriormente tratados com o MICROBExpress (Ambiom) para reduzir o percentual de rRNAs, mas nenhuma diferença significativa foi observado nos resultados (BEAUME et al., 2011).

O estudo do transcriptoma de *Herbaspirillum seropedicae* em diferentes condições de crescimento auxiliaria a esclarecer como ocorre o processo de interação *H. seropedicae*/planta e outros mecanismos e ainda permitiria o refinamento da anotação genômica.

**TABELA 03- REPRESENTANTES DE BACTÉRIAS QUE POSSUEM TRANSCRIPTOMA ESTUDADO POR RNA-seq ATÉ O MOMENTO**

<b>Espécies</b>	<b>Filo</b>	<b>Plataforma de Sequenciamento</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacillus anthracis</i>	Firmicutes	Illumina - SOLiD	Passalacqua <i>et al.</i> , 2009
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Betaproteobacteria	Illumina	Yoder-Himes <i>et al.</i> , 2009
<i>Listeria monocytogenes</i>	Firmicutes	Illumina	Oliver <i>et al.</i> , 2009
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Firmicutes	Illumina	Guell <i>et al.</i> , 2009
<i>Salmonella typhi</i>	Gammaproteobacteria	Illumina	Perkins <i>et al.</i> , 2009
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gammaproteobacteria	Illumina	Camarena <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus anthracis</i>	Firmicutes	SOLiD	Martin <i>et al.</i> , 2010
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Verrucomicrobia	Roche GS - FLX	Albrecht <i>et al.</i> , 2010
<i>Helicobacter pylori</i>	Epsilonproteobacteria	Roche FLX - Illumina	Sharma <i>et al.</i> , 2010
<i>Pseudomonas syringae</i>	Gammaproteobacteria	Illumina	Filiatrault <i>et al.</i> , 2010
<i>Staphylococcus aureus</i>	Firmicutes	Illumina	Beaume <i>et al.</i> , 2011
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Betaproteobacteria	SOLiD	Isabela & Clark, 2011
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Firmicutes	Illumina	Croucher <i>et al.</i> , 2011
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Gammaproteobacteria	SOLiD	Hamilton <i>et al.</i> , 2011

Bactérias e seus respectivos filios que foram submetidos a RNA-seq nas diferentes plataformas de sequenciamento. Adaptado de: PINTO *et al.*, 2011.

### 3. OBJETIVOS

Caracterizar funcionalmente genes de *H. seropedicae* cuja expressão é regulada por naringenina. Dezesseis estirpes mutantes de *H. seropedicae* que possuem expressão diferencial na presença do flavonóide naringenina serão avaliadas.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Determinar o perfil eletroforético dos lipopolissacarídeos (LPS) das estirpes mutantes de *H. seropedicae*.
- Avaliar a capacidade das estirpes mutantes de *H. seropedicae* em formar biofilme;
- Avaliar a capacidade das estirpes mutantes de *H. seropedicae* em aderir a raízes de plantas de milho;
- Avaliar a capacidade das estirpes mutantes de *H. seropedicae* em colonizar internamente raízes de plantas de milho;
- Avaliar a expressão dos genes mutados na presença de extrato de cana de açúcar;
- Determinar a expressão diferencial da estirpe selvagem SmR1 na presença e ausência de naringenina através da análise por RNA-seq.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 BACTÉRIAS E PLAMÍDEOS

As estirpes de bactérias utilizadas estão listadas na tabela 04.

**TABELA 04 – Estirpes de Bactérias**

<b>Estirpe</b>	<b>Referência</b>
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	MACHADO et al.; 1996.
<i>Escherichia coli</i> S17.1	SIMON et al., 1983.
<i>Escherichia coli</i> DH10B	GRANT et al., 1990.
<i>Escherichia coli</i> Top10	INVITROGEN
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS01	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS02	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS03	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS04	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS05	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS06	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS07	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS08	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS09	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS10	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS11	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS12	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS13	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS14	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS15	TADRA-SFEIR, 2008.
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MHS16	TADRA-SFEIR, 2008.

## 4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C em meio líquido Luria-Bertani (LB) e meio sólido Luria-Bertani agar (LA) (SAMBROOK et al., 1989). O meio sólido (LA) foi obtido pela adição de ágar (15g/L) ao meio líquido (LB).

O meio LB possui a seguinte composição:

Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	10 g/L
Triptona	10 g/L

As estirpes de *E. coli*, para preparação de células eletrocompetentes, foram cultivadas a 37°C em meio SOB. Após o choque elétrico as células foram recuperadas em meio SOC a 37°C (HANAHAHAN et al., 1983).

O meio SOB possui a seguinte composição:

Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	0,584 g/L
Cloreto de potássio	0,86 g/L
Triptona	20 g/L
pH	7,0

O meio SOC possui a seguinte composição:

Extrato de levedura	5 g/L
Glucose	3,6 g/L
Cloreto de sódio	0,6 g/L
Cloreto de potássio	0,19 g/L
Cloreto de magnésio	0,94 g/L
Sulfato de magnésio	1,2 g/L
Triptona	20 g/L

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas a 30°C sob agitação constante em meio NFbHP, utilizando malato (KLASSEN et al., 1997) como fonte de carbono e 20 mmol/L ou 2 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio. A sigla NFbHP refere-se a composição do meio, onde HP significa alto fosfato.

O meio NFb malato apresenta a seguinte composição:

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0 x 10 <sup>-1</sup> g/L
NaCl	1,0 x 10 <sup>-1</sup> g/L
CaCl <sub>2</sub>	2,0 x 10 <sup>-2</sup> g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 <sup>-2</sup> g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0 x 10 <sup>-2</sup> g/L
Ácido málico	5,0 g/L
Biotina	1,0 x 10 <sup>-4</sup> g/L
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0 x 10 <sup>-3</sup> g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2,35 x 10 <sup>-3</sup> g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,8 x 10 <sup>-3</sup> g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	8,0 x 10 <sup>-5</sup> g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,4 x 10 <sup>-4</sup> g/L
pH	6,5

A mistura de fosfato foi autoclavada separadamente e adicionada fria ao meio em um volume de 50 mL/L.

A composição da solução de fosfatos é:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .	17,8 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	159,5 g/L

### 4.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos que foram utilizados estão listados na Tabela 04.

**TABELA 05 – ANTIBIÓTICOS**

	Concentração utilizada na seleção de <i>H.</i> <i>seropedicae</i> (µg/mL)	Concentração utilizada para seleção de <i>E. coli</i> (µg/mL)
Ácido Nalidíxico (Nal)	5	10
Ampicilina (Amp)	-	250
Canamicina (Km)	500	50
Estreptomicina (Sm)	80	20
Gentamicina	80	20

As soluções de antibióticos, exceto gentamicina, foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore 0,23 µm). A solução de gentamicina foi adquirida comercialmente. Todas as soluções de antibióticos foram mantidas a -20°C.

### 4.4 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

A purificação dos plasmídeos a partir das culturas bacterianas foi realizada pelo método de lise alcalina modificado (SAMBROOK et al., 1989). Um mililitro e meio de uma cultura cultivada durante aproximadamente 12 horas foi centrifugado a 13.400 rpm por 1 minuto. O sedimento de células foi ressuspensão em 150 µL de tampão GET (50 mmol/L glucose, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 10 mmol/L de EDTA pH 8,0). A lise foi feita utilizando 150 µL de solução de lise contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e NaOH 180 mmol/L homogeneizados vagarosamente. Em seguida 150 µL de acetato de potássio 3 mol/L foram acrescentados e após

homogeneização a mistura foi mantida 5 minutos no gelo. As amostras foram então centrifugadas a 13.400 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi misturado com 150  $\mu$ L de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) e a mistura centrifugada a 13.400 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol, seguido de centrifugação a 13.400 rpm por 5 minutos. O DNA plasmidial foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos, seco e dissolvido em água ultrapura.

## **4.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO**

### **4.5.1 Preparo de células de *E. coli* eletrocompetentes**

Duzentos mililitros de meio SOB foram inoculados com 5 mL de uma cultura saturada de *E. coli* e incubados sob agitação a 37°C, até atingir uma D.O.<sub>600</sub> de 0,6. A cultura foi mantida no gelo durante 30 minutos e, em seguida, centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes com 50 mL de H<sub>2</sub>O estéril gelada, sendo então ressuspensas em 50 mL de glicerol 10%. Após centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos, o sedimento de células foi ressuspenso em aproximadamente 0,5 mL de glicerol 10%. A suspensão celular foi fracionada em alíquotas de 100  $\mu$ L e utilizadas ou armazenada a -70°C.

### **4.5.2 Transformação bacteriana por eletroporação**

O método utilizado para transformação bacteriana foi o descrito pelo fabricante (Gibco-BRL- Invitrogen). Resumidamente 1  $\mu$ L da mistura da ligação foi adicionada a 100  $\mu$ L da suspensão de células eletrocompetentes. Em seguida essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (BRL) sendo submetidas a um campo elétrico para permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1 mL de SOC e incubadas a 37°C, sob agitação por 1 hora. Após a incubação, alíquotas da



suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos adequados a fim de selecionar os transformantes.

#### **4.6 PURIFICAÇÃO DE DNA CROMOSSÔMICO DE *H. seropedicae*.**

Dez mililitros de uma cultura de células de *H. seropedicae* cultivada durante 12-16 horas foram centrifugados por 10 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µL de solução de GET. A suspensão de células foi incubada com lisozima (10 µg/mL) a 30°C durante 5 horas, seguido da adição de 50 µL de SDS 10% e incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Ao lisado celular foi acrescentado 200 µg/mL de pronase e a mistura foi incubada a 37°C por 16 horas. A desproteínização foi feita pelo tratamento com 250 µL de fenol equilibrado (pH 8,0); 250 µL de fenol-clorofórmio álcool isoamílico (25:24:1); 250 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1). O DNA presente na fase aquosa foi então precipitado pela adição de 3 volumes de etanol 96%. Após a centrifugação o etanol foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%. O precipitado foi seco em bomba de vácuo ou em estufa a 37°C e dissolvido em 100 ou 200 µL de água ultrapura autoclavada.

#### **4.7 ELETROFORESE DE DNA**

A determinação do perfil eletroforético dos plasmídeos ou do DNA cromossomal foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% (SAMBROOK et al., 1989). Após a eletroforese, os géis foram incubados com solução de brometo de etídio (EtBr) a 0,5 µg/mL. O complexo DNA-EtBr foi observado em transiluminador de ultra-violeta e a imagem foi registrada eletronicamente.

#### 4.8 SEQUENCIAMENTO DE DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando o método de didesoxinucleotídeos fluorescentes (KARGER et al., 1991) em seqüenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems, EUA). Para a incorporação dos didesoxinucleotídeos foi feito um sistema de reação contendo 300 ng de DNA, 5 pmol de oligonucleotídeo iniciador, complementar à seqüência desejada, e 3 µL do reagente *DYEnamic ET terminator reagent premix* (GE Helthcare), em volume total de 7,5 µL. A reação de sequenciamento foi feita em termociclador. O produto da reação foi precipitado adicionando-se 10 µL de H<sub>2</sub>O Ultra-Pura, 2 µl de acetato de amônio 7,5 mol/L e 60 µl de etanol 96%, seguido de repouso por 30 min. A mistura foi centrifugada a 13.400 rpm por 20 min, desprezando depois o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 80% e centrifugado a 13.400 rpm por 5 min.

Após secagem a vácuo, o precipitado resultante foi ressuspensão em 3 µL de tampão de aplicação. A leitura das sequencias foi realizada em seqüenciador automático ABI Prism 377.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASE

As estirpes mutantes foram crescidas a 30°C durante 6 horas em 3 mL de meio NFbHP malato contendo 2 mmol/L ou 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl na presença ou ausência do composto a ser analisado.

Cem microlitros desta cultura foram misturados com 900 µL de tampão Z e 50 µL de clorofórmio e incubados por 10 minutos à 30°C. Foram adicionados 200 µL do reagente o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG 4 mg/mL em tampão Z) para disparar a reação e após visualização de coloração amarela a reação foi interrompida pela adição de 500 µL de uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mol/L. Os tubos

de reação foram centrifugados a 13.400 rpm por 5 minutos e então feita a leitura e D.O.<sub>420</sub> e D.O.<sub>550</sub>.

A atividade específica de  $\beta$ -galactosidase foi dada em nanomoles de ONP formado por minuto por miligrama de proteína total (nmol ONP/min/mg proteína).

#### **4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por BRADFORD (1976) e adaptado para análise em bloco de 96 poços como descrito a seguir.

Alíquotas de 50  $\mu$ L de cultura de *H. seropedicae* foram transferidas para os poços de uma placa de polipropileno de 96 poços contendo 50  $\mu$ L de NaOH 0,2 mol/L. A placa foi vedada com adesivo, a solução homogenizada suavemente e incubada por pelo menos 30 minutos a 37°C. Após incubação, 30  $\mu$ L da amostra lisada foi transferida para uma placa de ELISA e foi adicionado 170  $\mu$ L de reativo de Bradford (100 mg de Coomassie blue G-250 dissolvido em 50 mL de etanol, 100 mL de ácido fosfórico 85% e completar para 1 L com H<sub>2</sub>O) e então foi realizada leitura da D.O.<sub>595</sub> em leitor de microplaca. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A curva padrão foi obtida utilizando BSA em concentrações de 0,6  $\mu$ g até 6  $\mu$ g.

#### **4.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE LPS (LIPOPOLISSACARÍDEOS) DAS ESTIRPES MUTANTES POR DOC-PAGE**

O perfil de lipopolissacarídeos das estirpes mutantes e selvagens foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida 18% DOC-PAGE (SERRATO; 2008) e coloração por prata (TSAI & FRASCH; 1982).

Para extração do LPS total as estirpes foram crescidas em NFbHPN até uma D.O.<sub>600</sub> igual a 1,0. As células foram centrifugadas e o precipitado lavado com 1 mL de solução salina. Ao precipitado foi adicionado 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q e 15  $\mu$ L

de proteinase K. Após 1 hora de incubação a 56°C, foi adicionado 100 µL de fenol equilibrado e novamente incubado por 30 minutos a 70°C, sempre homogeneizando nesta fase. A mistura foi centrifugada por 5 minutos e a fase aquosa e fase fenólica foram separadas. Acrescenta-se 20 volumes de acetona e congelou-se à -20°C por 12 horas.

Após este período, 5 µL de tampão de aplicação (Tris-HCl 120 mM pH 6,8; 3% SDS; 30% glicerol; 9% β-mercaptoetanol; 0,03% bromofenol azul) foi adicionado a uma alíquota de 10 µL da amostra e a corrida eletroforética foi feita em gel de poliacrilamida 18% por aproximadamente 4 horas.

Para visualização das amostras, os géis foram corados com prata como descrito a seguir. Após a corrida o gel foi fixado por 16 horas em etanol 40% e ácido acético 5% seguido de incubação por 5 minutos com etanol 40%, ácido acético 5% e ácido periódico 0,7%. Os géis foram lavados 3X com H<sub>2</sub>O destilada e o LPS foi corado com 50 mL de solução contendo 0,7 mL de NH<sub>4</sub>OH, 9,5 mL de NaOH 0,1 mol/L e 300 mg de AgNO<sub>3</sub>. Os géis foram lavados com água destilada, e então revelados com 50 mL de solução contendo 25 mg de ácido cítrico e 250 µL de formaldeído 37%, lavados e armazenados com água destilada.

#### **4.12 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME**

As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em dez mililitros de meio NFbHPN - Malato líquido contendo 0,05 g de lã de vidro, até atingir uma D.O.<sub>600</sub> igual a 1,0. A cultura foi então retirada e a lã de vidro foi corada com 200 µL de violeta de genciana 1%. A lã foi lavada 3x com 10 mL de solução salina sob agitação por 15 minutos e alguns fios foram retirados para análise de microscopia.

A lã de vidro passou então por um processo de descoloração com 2 mL de etanol 96% e a solução de etanol foi submetida a leitura em espectrofotômetro num comprimento de onda de 560 nm.

## **4.13 ENSAIOS DE COLONIZAÇÃO E ADESÃO EM PLÂNTULAS DE MILHO**

### **4.13.1 Esterilização das sementes de milho**

As sementes de milho foram esterilizadas em 100 mL de solução contendo 12% v/v de hipoclorito e 0,4% de tween 20 por 20 minutos e posteriormente em solução de etanol 70% por 5 minutos. Foram então lavadas com H<sub>2</sub>O Ultrapura estéril e então colocadas em bloco de 96 poços com papel filtro embebidos com Plant Medium para germinação. A germinação foi feita em estufa a 37°C por 2 dias.

### **4.13.2 Ensaio de adesão a raiz de milho**

As sementes germinadas foram inoculadas com 10<sup>5</sup> células estirpes de *H.seropedicae*, numa proporção de uma semente geminada para 1,0 mL de inóculo, durante 15 minutos. Posteriormente elas foram lavadas com solução salina estéril por 1 minuto, 2 vezes. Então a raiz foi cortada colocada em tubo de 1,5 mL de polipropileno e pesada. Após a pesagem as raízes foram imersas em 1 mL de NFb malato líquido e vortexadas. Esta solução foi então diluída serialmente até 10<sup>-5</sup> e as diluições plaqueadas em meio NFbHPN malato sólido. Após 24 e/ou 48 horas foi feito a contagem de colônias. Os resultados foram expressos em UFC/g raiz (Unidades Formadoras de Colônias por grama de raiz).

### **4.13.3 Ensaio de colonização endofítica da raiz de milho**

Os ensaios de colonização foram realizados 24 e 72 horas após a inoculação. As sementes germinadas foram inoculadas com as estirpes de *H. seropedicae* 10<sup>5</sup> células, numa proporção de uma semente germinada para 1,0 mL de inóculo, durante 15 minutos e foram transferidas para blocos de 96 poços e deixadas por 24 ou 72 horas. Após o período, as plantas foram esterilizadas com banhos de hipoclorito 2% por 2 minutos, etanol 70% por 2 minutos e H<sub>2</sub>O

Ultrapura estéril 2x por 2 minutos. A raiz foi cortada, colocada em tubo de 1,5 mL de polipropileno e pesada. Após a pesagem as raízes foram maceradas e diluídas em 1 mL de NFb malato líquido. Foram colocadas na placa em forma de microgota as diluições seriadas até  $10^{-5}$  em meio NFbHPN malato sólido. Após 24 e/ou 48 horas foi feito a contagem de colônias. Os resultados foram expressos em UFC/g raiz (Unidades Formadoras de Colônias por grama de raiz).

#### **4.14 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL (qRT-PCR)**

A validação da expressão diferencial foi feita por PCR em Tempo Real. Oligonucleotídeos específicos para cada gene foram desenhados usando o programa Primer 3 Express (Applied Biosystem) (Tabela 6). Estes oligonucleotídeos foram usados em reações de PCR utilizando o sistema *SYBRGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems).

**TABELA 06 – OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NO PCR EM TEMPO REAL**

<b>Gene</b>	<b>Universal</b>	<b>Reverso</b>
<i>EpsG</i>	GATGGTCAGATGGTGGCAG	TCATGTGGCTCACGTTCTTG
<i>EpsB</i>	ATGCGCGACCTGCATACC	GGGTTGACGCCGATGATG
<i>Hsero_2207</i>	AGCGAAAAGCGGAAGTCTGA	GCACTATGCACAAGCCAGTGA
<i>Hsero_0499</i>	CGAACCGATGCATGAGCATA	CCTATTCGGATAGCGCGAAA
<i>Hsero_0981</i>	GCTGGTTTCGTTTCCAACATC	CGGCCGAAGTATCGAAATAGC
<i>ampG</i>	CGCGGATGGATGGTGTTC	CATGCCGCCGATGGAA
<i>atoA</i>	CAGGACGGCTTCTACGTGAAC	ATATCGCTGGGAACGTGGTT
<i>trmU</i>	GAAGGAACAGGGATATGAGGTCAT	GTATTCCGAATCGTCGTCATCTT
<i>Hsero_3478</i>	CCGGCACCGCAGAAATACT	ACTTGGCCATGCATGAAATG
<i>bioF</i>	CTTCGATGCCCTGAGCTACAT	GAATGGACGTTGCGGTGAAC
<i>Hsero_3479</i>	AGGCGTGTTGTGTTTTGTGA	TAGAAGCCGTGCCTTTTAGC
<i>Hsero_4761</i>	TGCATCGGCGACATTGC	GCCACCTTGTGTTCGAAGTAGAC
<i>Hsero_2254</i>	CGGCTCTCGGGATTGTTCT	TCAGCGGACCACAATCCA
<i>Hsero_3478</i>	CCTGATCCCGCTGCTCTTC	ACTTTCGCGTTGCAGCATTT
<i>Hsero_4278</i>	ATGACCACGCTGCCAAATC	GATGGATAGAGCACCGGAATACC
<i>gumH</i>	TCGCCCCGTATCCAGGAGTT	ACGACCAGTATCGAGCACTGTATG
<i>Hsero_1816</i>	AAAGGCCAATGAAGTGATCGA	CAAGCAGGTTCAACAAAAAGTCA
<i>16SrRNA</i>	TGTCAGGGAAGAAACGGTTTTG	AGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCA

#### **4.14.1 Isolamento de RNA total pelo método do Trizol**

*H. seropedicae* estirpe SmR1 foi cultivado nas condições desejadas e 1,5 mL de cultura foi centrifugado a 13.400 rpm por 60 segundos. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de reagente Trizol<sup>®</sup> foi adicionado. O homogenato foi deixado a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio, misturado vigorosamente por 15 segundos e a amostra foi incubada por 2-3 minutos a temperatura ambiente. Na sequência, a amostra foi centrifugada (13.400 rpm, 5 min) e a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo

tubo, no qual o RNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol, lavado com etanol 75% e ressuspenso em 50 µL de água ultrapura livre de RNase. Após, o RNA foi purificado e visualizado em gel de agarose 1%. Foram realizadas extrações de replicatas biológicas.

#### **4.14.2 Síntese de cDNA**

Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa utilizando o Kit High Capacity (Applied Biosystems) seguindo protocolo do fabricante a partir de 2 µg de RNA total tratado previamente com DNase I.

#### **4.14.3 Reação de PCR em Tempo Real**

O sistema de reação total continha volume de 5 µL, sendo que 1 µL de cDNA, 1 µL de oligonucleotídeos (0,5 µL de cada em uma concentração de 10 pmol), 0,5 µL de água ultrapura livre de RNase e 2,5 µL de *SYBRGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em triplicata.

### **4.15 TRANSCRIPTOMA**

#### **4.15.1 Isolamento de RNA total**

O isolamento do RNA total da estirpe SmR1 de *H. seropedicae*, crescida na ausência ou presença de naringenina, foi feito utilizando o kit de isolamento de RNA Ribopure Bacteria (Ambion) conforme o protocolo do fabricante.

#### **4.15.2 Tratamento com DNaseI**

Para inativar possíveis DNases presentes no RNA total extraído, foi adicionado às amostra de RNA tampão Dnase Buffer e 2 µL de Dnase I (2U/µL). A mistura foi incubada em estufa 37 °C por no mínimo 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 20% do volume da amostra de solução inativante



(*DNase Inactivation Reagent*), e mantida a temperatura ambiente por 2 minutos (homogeneizada vigorosamente duas vezes neste período). Após incubação, a mistura foi centrifugada (13.400 rpm) por 60 segundos para precipitar a solução inativante. O sobrenadante, contendo o RNA, foi transferido para um novo tubo. Em seguida, um gel de agarose 1%, livre de RNase, foi feito para analisar o RNA extraído.

#### **4.15.3 Precipitação das amostras de RNA**

O RNA extraído foi precipitado com 10% de acetato de sódio (3 mol/L), 2% de glicogênio e 3 volumes de etanol 96%. Na sequência as amostras foram centrifugadas (13.400 rpm) por 15 minutos, o sobrenadante retirado cuidadosamente e o precipitado de RNA lavado com 500 µL de etanol 70% gelado, centrifugado (13.400 rpm) por 15 minutos, o sobrenadante retirado cuidadosamente e o precipitado seco em câmara de vácuo por 30 minutos e dissolvido em 15 µL de água estéril livre de RNase.

#### **4.15.4 Depleção de rRNA**

O RNA total dissolvido em 15 µL de água (contendo de 4 – 10 µg de RNA) foi depletado de RNA ribossomal utilizando o kit MICROBExpress™ (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.15.5 Construção e sequenciamento das bibliotecas de cDNA**

Para a construção das bibliotecas para sequenciamento,  $\cong$ 500 ng de RNA depletado de rRNA, em no máximo 8 µL, foi utilizado no kit SOLiD™ Whole Transcriptome Analysis Kit seguindo as indicações do fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em aparelho SOLiD 4 (Life Technology).

#### **4.15.6 Análise do transcriptoma**

As sequências obtidas foram inicialmente comparadas e mapeadas com os dados do genoma de *H. seropedicae* SmR1 utilizando o programa SHRiMP

(DAVID et al., 2011). Para a análise e normalização das bibliotecas as leituras correspondente a genes de tRNA foram excluídos. A normalização das leituras foi feita pelo método de RPKM (MORTAZAVI et al., 2008), que considera o tamanho da biblioteca, o tamanho dos genes e o número de leituras por gene, utilizando a equação a seguir. As análises para expressão diferencial dos genes foi feita no programa Excel®.

$$\text{RPKM} = \frac{C \cdot 10^9}{L \cdot N}$$

C = número de leituras por gene

L= tamanho do gene (kilobase)

N = tamanho da biblioteca (número total de leituras por replicata biológica)

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

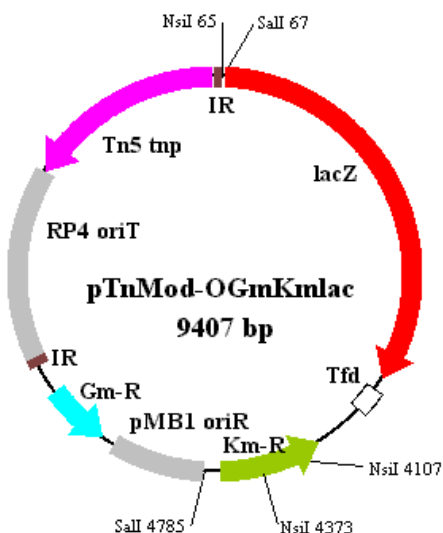
### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES MUTADOS DAS ESTIRPES MHS05, MHS06, MHS11 E MHS13 DE *H. seropedicae*

Uma biblioteca de 5.000 estirpes mutantes aleatórios de *H. seropedicae* foi analisada e vinte e dois genes foram encontrados respondendo ao flavonóide naringenina e doze destes genes foram identificados (Tabela 01) (TADRA-SFEIR, 2008).

No presente trabalho, 4 estirpes mutantes contendo o transposon TnMod-OGmKmLacZ, oriundo do plasmídeo mutagênico pTnMod-OGmKm/lacZ (SCHWAB *et al.*, 2007) (Figura 06), tiveram o seu DNA genômico extraído e digerido com a enzima de restrição *NarI*, os fragmentos foram ligados e posteriormente transformados em *E. coli* estirpe Top10 ou DH10B. A seleção dos transformantes foi realizada através do antibiótico canamicina e os plasmídeos isolados foram então seqüenciados.

As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados do Projeto de Seqüenciamento do Genoma de *H. seropedicae* ([www.genopar.org](http://www.genopar.org)). Isto permitiu identificar os sítios de inserção do transposon de pTnMod-OGmKmlacZ no genoma de *H. seropedicae*. Na Tabela 07 estão listadas as ORFs e os genes identificados com suas respectivas funções nas quatro estirpes mutantes.

**FIGURA 06 - MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pTnMod-OGmKm/lacZ (SCHWAB *et al.*, 2007)**



Este plasmídeo foi utilizado para obtenção de uma coleção de mutantes aleatórios de *H. seropedicae* SmRI. Entre as IRs (seqüências repetitivas invertidas) está localizada a região que sofre transposição, contendo a *oriR*, o gene repórter *lacZ* e os genes que conferem resistência aos antibióticos canamicina ( $Km^R$ ) e gentamicina ( $Gm^R$ ).

**TABELA 07 - IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE *H. seropedicae* REGULADOS POR NARINGENINA EM 4 ESTIRPES MUTANTES**

Estirpe Mutante	Nome do gene	Produto ou Função do gene
MHS05 (13C4)	<i>ampG</i> Hsero_0093	Muropeptídeo permease
MHS06 (13C6)	<i>atoA</i> Hser_4637	acilCoA:acetate/3 cetoacido CoA transferase, subunidade $\beta$
MHS11 (39B7)	Hsero_4761	Proteína hipotética
MHS13 (39G6)	Hsero_3748	Proteína hipotética

Estirpes mutantes e números das ORFs identificadas no genoma de *H. seropedicae* com nome dos genes e seus respectivos produtos ou funções.

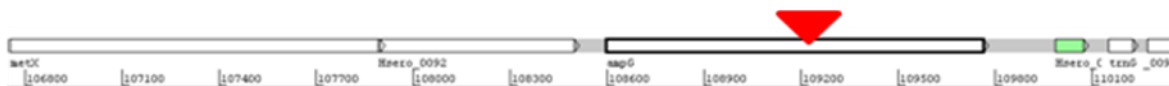
### 5.1.1 ESTIRPE MUTANTE MHS05 (muropeptídeo permease – AmpG)

Na estirpe mutante MHS05 a inserção do transposon ocorreu no gene que codifica para proteína AmpG, uma muropeptídeo permease. Esta proteína está localizada na membrana de bactérias Gram-negativas e é muitas vezes necessária para ancoragem de peptideoglicanos (Chahboune *et al.*, 2005). O peptideoglicano, por vezes denominado mureína, é um heteropolissacarídeo ligado a peptídeos presente na parede celular de bactérias. É formado por dois tipos de açúcares (o ácido *N*-acetilmurâmico e a *N*-acetilglucosamina) e alguns aminoácidos e é a estrutura que confere rigidez à parede celular de bactérias e determina sua forma (Boneca, 2005).

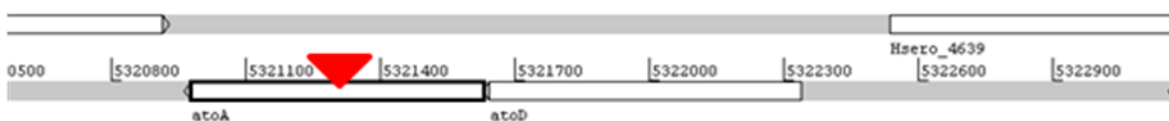
Análises bioinformáticas da sequência da proteína de *H. seropedicae*, utilizando o programa Pfam (FINN et al., 2010), demonstra que a proteína possui diversas regiões de hélices transmembrana, corroborando com os dados da literatura e que a disposição no genoma de *H. seropedicae* (Figura 07A) é semelhante a de outras  $\beta$ -proteobactérias (Figura 08). O gene *ampG* se encontra aparentemente em um operon com outros dois genes, o gene *metX* e um gene que codifica para uma proteína hipotética. O gene *metX* codifica para uma homoserina O-acetiltransferase.

**FIGURA 07 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TnMOD-OGmKmLacZ NO GENOMA DAS ESTIRPES MUTANTES**

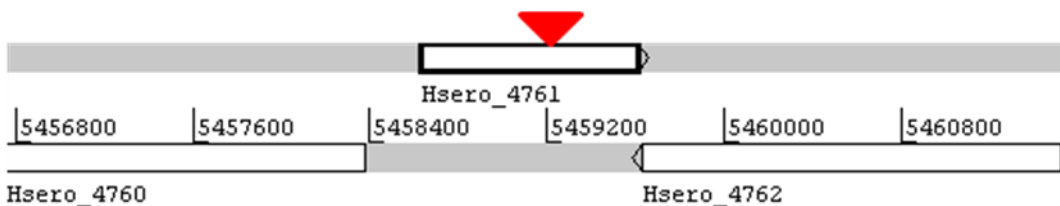
**A)**



**B)**



**C)**

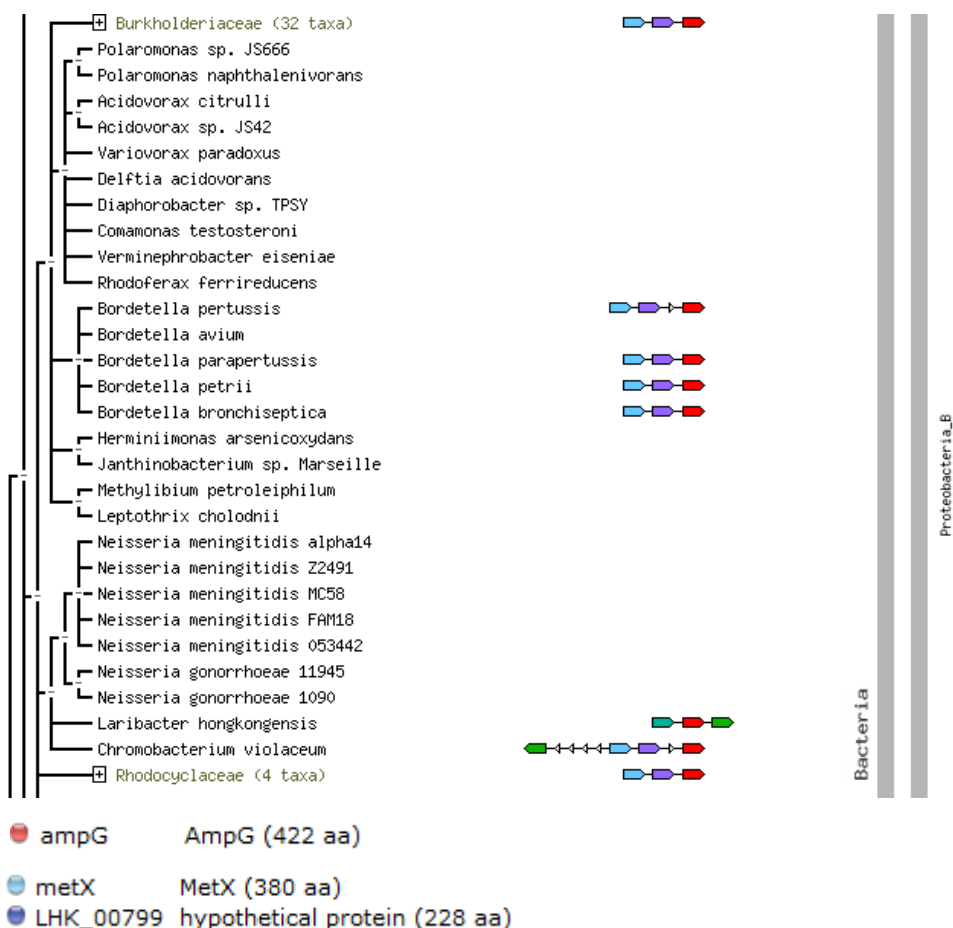


**D)**



Região dos genes mutagenizados (MHS05 – A, MHS06 – B, MHS11 – C e MHS13 - D) no genoma de *H. seropedicae*. Os dados foram visualizados utilizando o Artemis v12 (RUTHERFORD et al., 2000) com o genoma do *H. seropedicae* SmR1 como referência. A seta vermelha indica a posição onde o transposon foi inserido.

**FIGURA 08 - ANÁLISE DE VIZINHANÇA DO GENE QUE CODIFICA PARA PROTEÍNA AmpG EM  $\beta$ -PROTEOBACTÉRIAS.**



Vizinhança do gene *ampG* em  $\beta$ -proteobactérias. Os dados foram analisados utilizando o programa String (SNEL et al., 2000). Em círculos coloridos está destacado a cor que cada gene está representado no diagrama de vizinhança.

### 5.1.2 ESTIRPE MUTANTE MHS06 (*atoA*)

Na estirpe mutante MHS06 a inserção do transposon ocorreu no gene *atoA* que codifica para uma acil CoA:acetato/3-cetoacido CoA transferase, subunidade  $\beta$ , uma proteína que envolvida no transporte e metabolismo de lipídios (Figura 7B). No genoma de *H. seropedicae* este gene encontra-se em um operon com o gene *atoD* que codifica para uma acil CoA:acetato/3-cetoacido CoA transferase, subunidade  $\alpha$ . Esta organização do genoma de *H. seropedicae* é comum a organização encontrada em outros organismos como *E. coli* e estas duas enzimas estão envolvidas na degradação de acetoacetato que pode ser utilizado por bactérias como fonte de carbono (JENKINS & NUNN, 1987).

### 5.1.3 ESTIRPE MUTANTE MHS11 (Proteína Hipotética)

Na estirpe MHS11 a inserção do transposon ocorreu no gene Hsero\_4761 que codifica para uma proteína hipotética. Este gene encontra-se em uma região com outros genes que codificam para proteínas hipotéticas no genoma de *H. seropedicae* (Figura 7C). Analisando a sequência de nucleotídeos no NCBI via BlastP (National Center for Biotechnology Information) houve identidade de 100% com um regulador transcricional, da família MarR, de *Burkholderia sp.* H160, com e-value de  $2e-112$ . Proteínas da família MarR estão envolvidas com resistência à antibióticos e outros sistemas específicos de resistência e um número grande de compostos induz a expressão do operon *mar* (SULAVIK et al., 1997).

### 5.1.4 ESTIRPE MUTANTE MHS13 (Proteína Hipotética)

A estirpe MHS13 contém o transposon inserido no gene Hsero\_3748 que codifica para uma proteína hipotética. Este gene provavelmente encontra-se em um operon com outro gene (Hsero\_3749) que codifica para uma proteína de resposta de sistema de dois componentes (Figura 7D).



## 5.2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS ESTIRPES MUTANTES

Uma vez que as dezesseis estirpes mutantes (MHS01 a MHS16) possuem expressão diferencial na presença de naringenina, um flavonóide, composto que pode afetar a interação da bactéria com plantas, ensaios fisiológicos foram realizados para verificar se os genes afetados podem estar relacionados com a interação *H. seropedicae*/planta. Todas as estirpes mutantes foram submetidas a extração total de lipopolissacarídeos (LPS), ensaios de adesão e colonização endofítica em raiz de milho, ensaios de formação de biofilme em substrato inerte e verificação de crescimento em diferentes concentrações de naringenina. Alguns outros ensaios foram realizados, mas somente com algumas estirpes, como é caso de verificação da atividade na presença de extrato de cana de açúcar e avaliação do efeito das estirpes em plantas de arroz.

## 5.3 PADRÃO ELETROFORÉTICO DE LPS DAS ESTIRPES MUTANTES DE *Herbaspirillum seropedicae*.

O padrão de corrida eletroforética de LPS das estirpes mutantes foi determinado. A extensão da heterogenidade de LPS é facilmente observada em amostras separadas por SDS-PAGE. Este procedimento é especialmente utilizado para determinar o número e a distribuição de repetições de O-antígeno que exibem uma escala de banda depois de coradas com prata (LEROUGE & VANDERLEYDEN, 2001; BROUGHTON et al., 2006).

O padrão eletroforético de LPS das estirpes mutantes foi comparado com o da estirpe selvagem. Somente a estirpe MHS05 possui um padrão de corrida eletroforética de LPS diferente da estirpe selvagem, indicando que a mutação na proteína AmpG alterou a estrutura do LPS desta estirpe mutante (Figura 09).

A camada de peptideoglicanos (PG) de bactérias gram-negativas é uma rede rígida que protege contra lise osmótica e auxilia a determinar o tamanho e a

forma das células, permitindo ainda a difusão de moléculas dentro da célula (BONECA, 2005; ADIN et al., 2009; PLUMBRIDGE, 2009). Em PG, subunidades repetidas *N*-acetilglucosamina e *N*-acetilmurânico estão ligados a uma cadeia curta de um pentapeptídeo e estes açúcares sofrem reciclagem para acomodar a célula em crescimento. A proteína AmpG permite que os monômeros de açúcares entrem no citoplasma, sejam reciclados e novamente incorporados ao PG (CHAHBOUNE et al., 2005; ADIN et al., 2009). Apesar desta proteína permitir o crescimento e expansão celular, mutantes neste gene em *E. coli* não foram afetados quanto ao crescimento e divisão celular e mutantes em *Neisseria gonorrhoeae* demonstraram um aumento na liberação de monômeros de PG sugerindo que AmpG continuava funcional (ADIN et al., 2009).

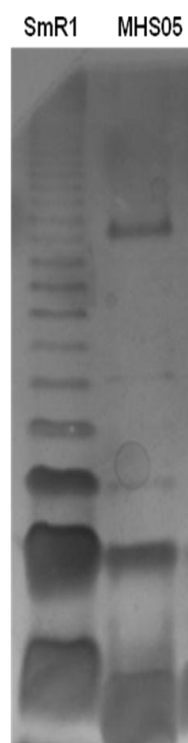
Outra alteração notada em mutantes no gene *ampG* de *E. coli* foi a redução da quantidade de *N*-acetilglucosamina no extrato celular da bactéria (PLUMBRIDGE, 2009). *N*-acetilglucosamina, além de ser um componente de PG também está presente na molécula de lipopolissacarídeos e uma diminuição na quantidade deste açúcar poderia explicar o padrão diferencial de LPS na estirpe mutante MHS05 em comparação com a estirpe selvagem. A proteína AmpG sendo uma proteína de membrana também poderia auxiliar na ancoragem do LPS de *H. seropedicae* e uma mutação nesta proteína poderia desestabilizar esta ancoragem.

### **5.3.1 Análise do Lipídeo-A do LPS da estirpe selvagem e da estirpe MHS05**

Os LPSs são constituídos por três regiões: lipídeo A, núcleo de oligossacarídeos e polissacarídeo O (antígeno O) (LEROUGE & VANDERLEIDEN, 2001). Uma vez que o perfil eletroforético do LPS da estirpe mutante MHS05 foi diferente da estirpe selvagem a porção do lipídeo A foi analisada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. O espectro obtido para estirpe selvagem SmR1 foi bastante similar ao descrito e elucidado por Serrato e colaboradores (2008). Os valores de *m/z* dos espectros da estirpe mutante MHS05 mostraram-se bem diferente da estirpe selvagem (Figura 10) como demonstrado pelo perfil eletroforético. Os dados de análise de MALDI juntamente com o DOC-

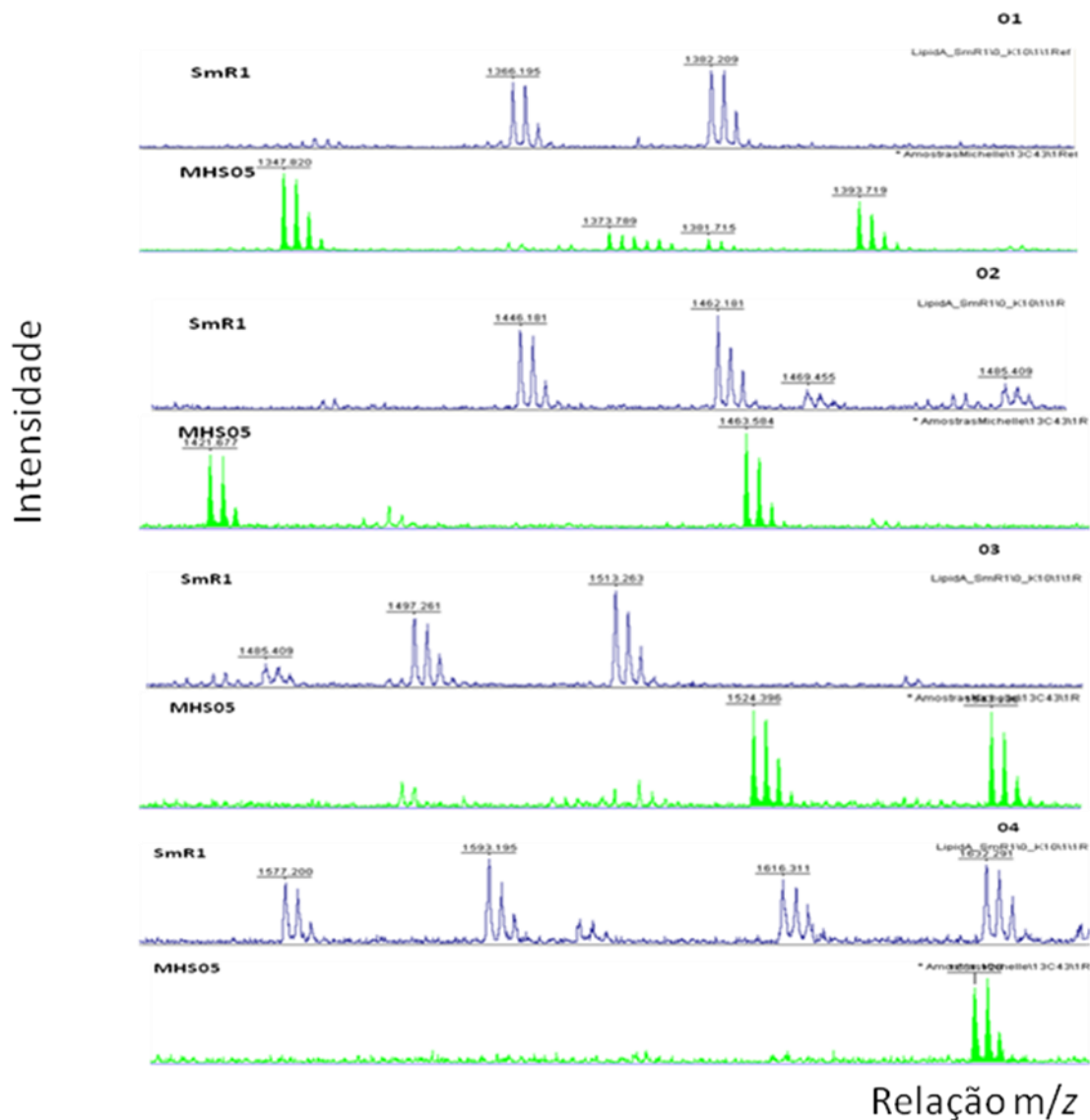
PAGE indicam que o LPS da estirpe MHS05 é totalmente diferente da estirpe selvagem, entretanto novos dados precisam ser obtidos para elucidação completa desta estrutura.

**FIGURA 09 – PADRÃO ELETROFORETICO DE LPS DA ESTIRPE MUTANTE MHS05 E DA ESTIRPE SELVAGEM DE *H. seropedicae* SmR1**



Gel DOC-PAGE 18% de LPS corado com prata. O LPS das estirpes mostradas na figura foi extraído com fenol.

**FIGURA 10 – ESPECTRO DE MALDI-TOF DO LIPÍDEO-A DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 E DA ESTIRPE MUTANTE MHS05 DE *H. seropedicae***



Espectros de MALDI-TOF do lipídeo-A da estirpe selvagem SmR1 e da estirpe mutante MHS05 de *H. seropedicae*. Divisão dos espectros em quatro partes demonstrando os detalhes da diferença de massa carga das duas estirpes.

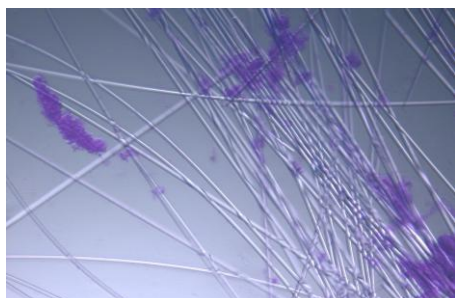
#### 5.4 CAPACIDADE DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae* DE FORMAR BIOFILME

A capacidade das estirpes mutantes de formar biofilme foi testada. A formação de biofilme é uma forma das comunidades bacterianas aderirem a um determinado substrato (O'TOOLE & KOLTER,1998). Chen & Stewart (2002) concluíram que EPS é responsável pelos processos de adesão em substratos e que são cruciais na manutenção integral da estrutura de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*.

Uma vez que foram identificados mutantes em genes que podem influenciar na formação de biofilme, como é o caso do mutante no gene *epsG* (MHS01), as estirpes mutantes foram testadas quanto a capacidade de formar biofilme.

Primeiramente foi realizado um ensaio de formação de biofilme com a estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1. Foi avaliada a formação após 40 horas de crescimento (Figura 11) e posteriormente foi realizado um ensaio de acompanhamento da formação de biofilme, ao longo do tempo, no intervalo entre 5 e 35 horas (Figura 12). Estes ensaios foram avaliados qualitativamente através de microscopia óptica e também quantitativamente através da medida da D.O.<sub>560</sub> (Figura 13).

**FIGURA 11 – ENSAIO QUALITATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 DE *H. seropedicae*.**



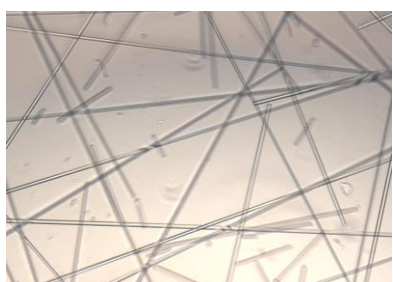
**(A)**



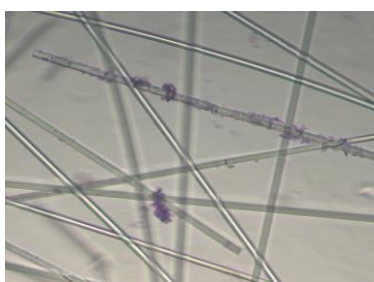
**(B)**

Microscopia óptica da formação de biofilme da estirpe selvagem SmR1 após 40 horas de crescimento em objetiva de 12X (A) e objetiva de 25X (B). A coloração utilizada foi violeta de genciana.

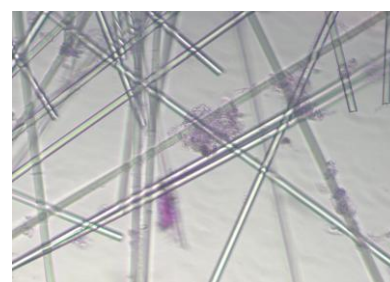
**FIGURA 12 – ENSAIO QUALITATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 DE *H. seropedicae* NO DECORRER DE 35 HORAS.**



**05 HORAS**



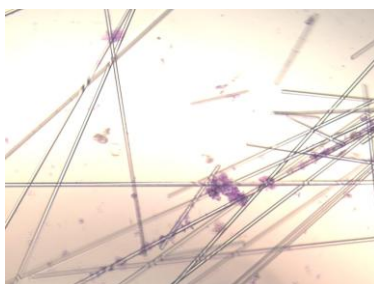
**08 HORAS**



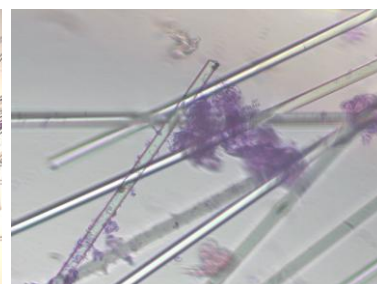
**10 HORAS**



**30 HORAS**



**35 HORAS (A)**

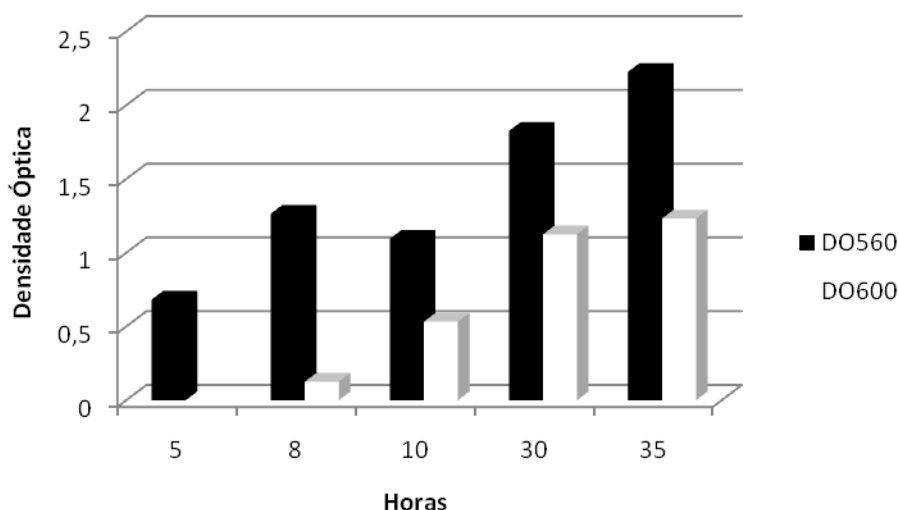


**35 HORAS (B)**

Microscopia óptica da formação de biofilme da estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* no decorrer de 35 horas em objetiva de 12X (fotos 05, 30 e 35(A)

horas) e objetiva de 25X (08, 10 e 35(B) horas). A coloração utilizada foi violeta de genciana.

**FIGURA 13 – ENSAIO QUANTITATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 DE *H. seropedicae* NO DECORRER DE 35 HORAS.**

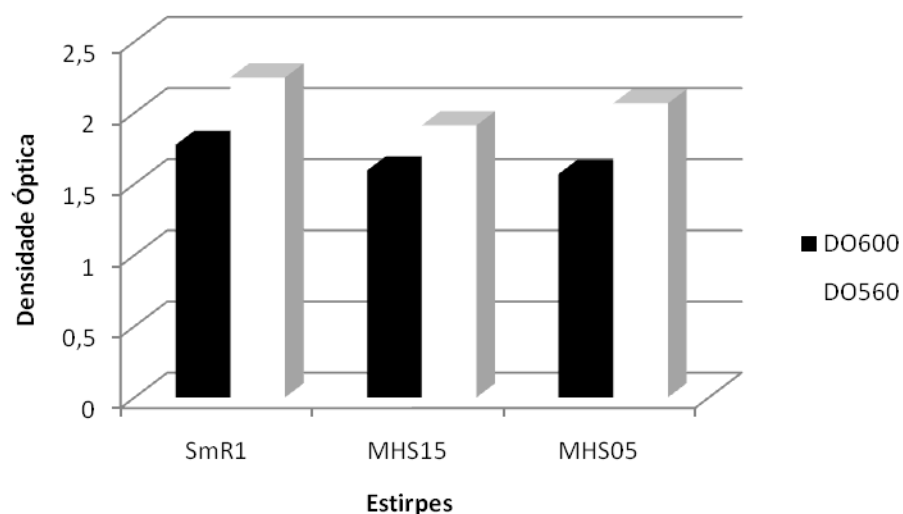


Avaliação da formação de biofilme da estirpe selvagem SmR1 no decorrer de 35 horas. Foi avaliado o crescimento da bactéria através da D.O<sub>600</sub> e da formação de biofilme através do processo de descoloração da lã de vidro medido por D.O<sub>560</sub>. Os ensaios foram realizados em replicata biológica.

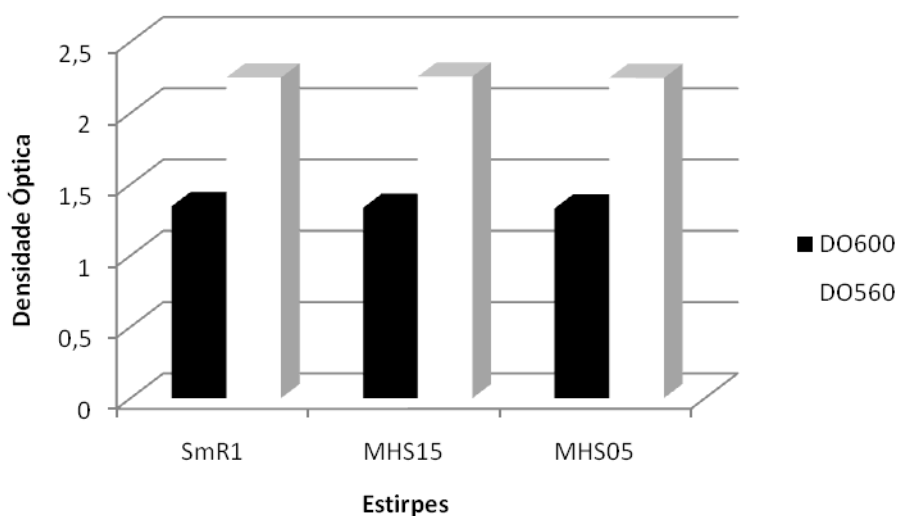
Depois de analisarmos os dados de formação de biofilme pela estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae*, realizamos ensaios quantitativos (descoloração da lã de vidro) com as estirpes mutantes após um crescimento de 30 horas.

As primeiras estirpes analisadas foram as estirpes MHS05 e MHS15, mutantes no gene *ampG* e uma provável glicosiltransferase (*gumH*), e foram avaliados o crescimento da bactéria juntamente com a formação de biofilme após 24 e 36 horas de crescimento (Figura 14).

**FIGURA 14 – ENSAIO QUANTITATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS ESTIRPES MUTANTES MHS05 E MHS15.**



**(A)**



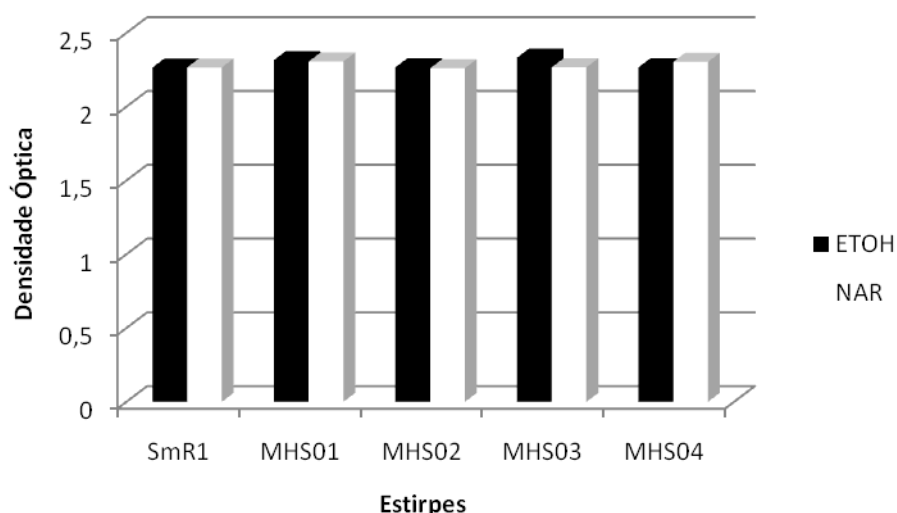
**(B)**

Avaliação da formação de biofilme das estirpes mutantes MHS05 e MHS15 comparado com a estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* após 24 (A) e 36 horas (B). Foi avaliado o crescimento das bactérias através da D.O<sub>600</sub> e da formação de biofilme através do processo de descoloração da lã de vidro medido por D.O<sub>560</sub>. Os ensaios foram realizados em replicata biológica.



As demais estirpes mutantes foram avaliadas quanto a formação de biofilme após 24 horas de crescimento e na presença ou ausência de naringenina (50  $\mu\text{mol/L}$ ) e como controle foi utilizado etanol 80% na mesma proporção da solução de naringenina, uma vez que o flavonóide foi diluído neste solvente (Figura 15).

**FIGURA 15 – ENSAIO QUANTITATIVO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DAS ESTIRPES MUTANTES NA PRESENÇA DE NARINGENINA.**



Avaliação da formação de biofilme das estirpes mutantes comparado com a estirpe selvagem SmR1 após 24 horas de crescimento na presença de naringenina (50  $\mu\text{mol/L}$ ) e como controle etanol 80%. Foi avaliado a formação de biofilme através do processo de descoloração da lâ de vidro medido por D.O<sub>560</sub>. Os ensaios foram realizados em replicata biológica.

Estes dados indicam que nenhuma das estirpes mutantes analisadas mostrou um padrão quantitativo diferente da estirpe selvagem. Podemos notar que o valor da D.O<sub>560</sub> relativo a formação de biofilme fica em torno de 2,0 e 2,5. Com isso podemos inferir que nenhum dos genes mutagenizados é importante na formação de biofilme neste método utilizado. Sendo importante ressaltar que mesmo a mutação no gene *epsG* (estirpe MHS01), um gene relacionado com biossíntese de exopolissacarídeos, não alterou a formação de biofilme.

## 5.5 ENSAIOS DE ADESÃO E COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA EM PLANTAS DE MILHO

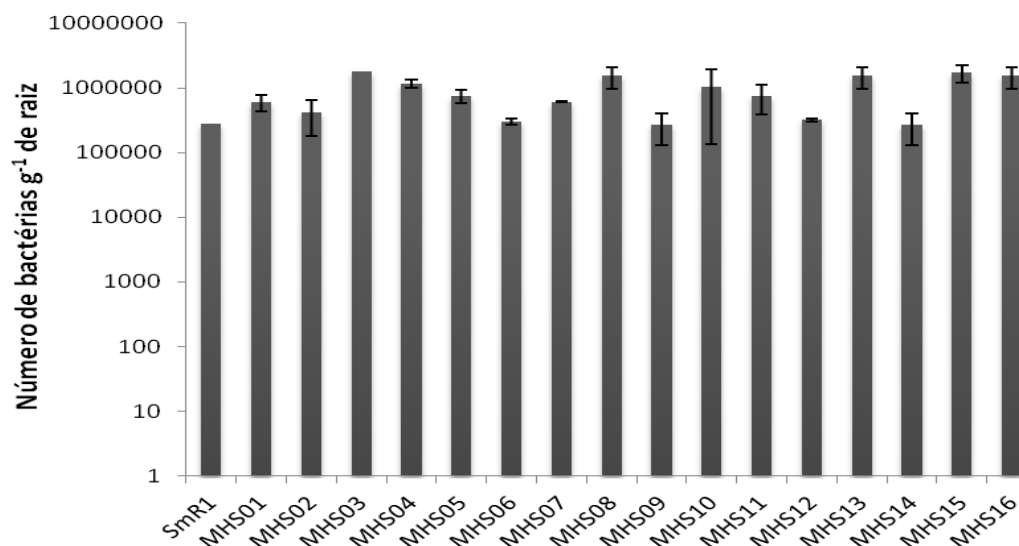
As estirpes mutantes de *H. seropedicae* foram utilizadas em ensaios de adesão e colonização em milho (*Zea mays*). A adesão/colonização destas bactérias nos hospedeiros foi acompanhada por reisolamento. Mutações em genes relacionados com LPS e EPS podem afetar a adesão e colonização, das estirpes, em plantas uma vez que estes genes já foram descritos como importantes na interação planta-bactéria (BROUGHTON et al., 2006 e LONG & STASKAWICZ, 1993).

A partir do ensaio de adesão realizado podemos observar que nenhuma das estirpes mutantes avaliadas apresentou padrão diferencial em comparação com a estirpe selvagem (Figura 16). Estes resultados sugerem que estes genes mutagenizados não interferem no processo de adesão em plantas de milho.

Nos ensaios de colonização endofítica observamos que a estirpe mutante MHS05 apresentou redução da colonização em até 100x, comparado com a estirpe selvagem, 1 e 3 dias após a inoculação (Figura 17). Estes resultados sugerem que a mutação no gene *ampG* é importante no processo de interação *Herbaspirillum seropedicae*/planta.

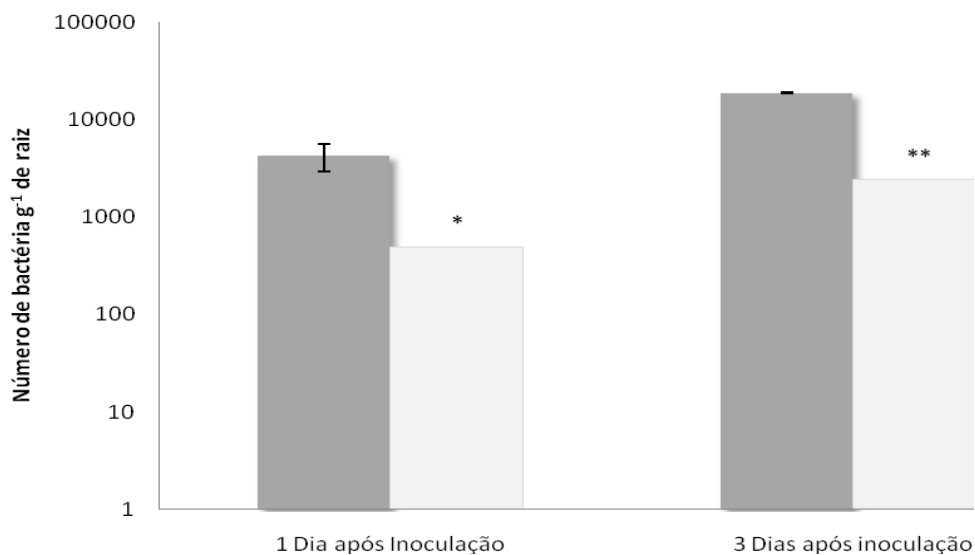
Balsanelli e colaboradores (2010) demonstraram que os mutantes com padrão eletroforético de LPS diferente do selvagem apresentavam redução no padrão de adesão e colonização, e que um monossacarídeo importante no processo de adesão é N-acetilglucosamina, açúcar este que não está presente nestes mutantes, assim como rhamnose. A adesão da estirpe mutante MHS05 a raízes de milho foi testada na presença de N-acetilglucosamina. Os resultados mostraram uma diminuição na adesão na presença de N-acetilglucosamina, assim como observado na estirpe selvagem (Figura 18). Isto indica que apesar da estrutura de LPS desta estirpe ser diferente a da estirpe selvagem, ela ainda contém um monossacarídeo importante para adesão que é a N-acetilglucosamina.

**FIGURA 16 – PADRÃO DE ADESÃO DAS ESTIRPES MUTANTES**



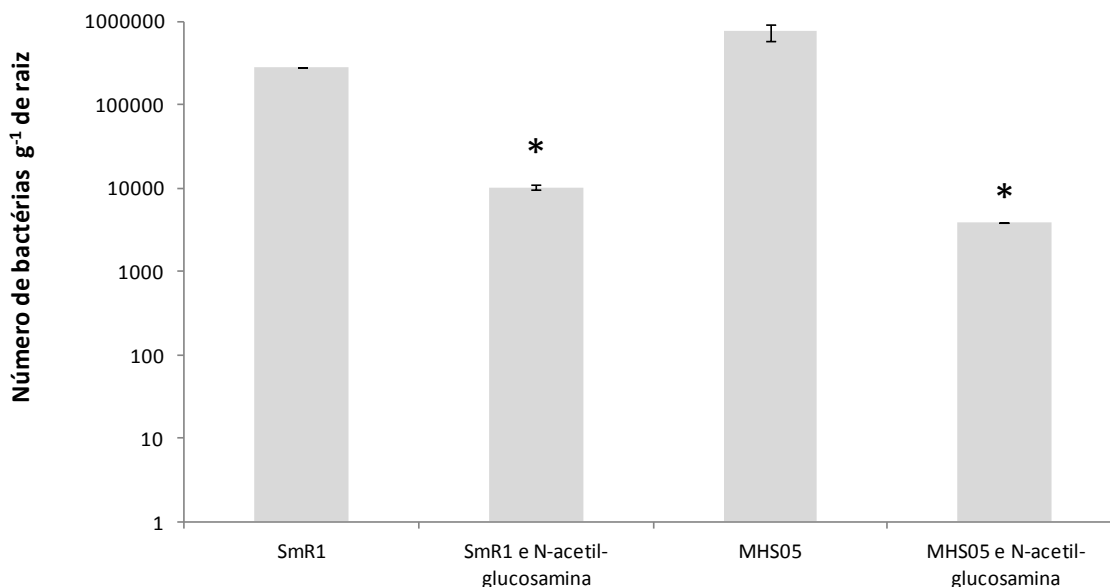
Padrão de adesão em raiz de milho das estirpes mutantes e da estirpe selvagem. A unidade utilizada foi Unidades Formadora de Colônia (UFC)/ grama (g) de raiz. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

**FIGURA 17 – PADRÃO DE COLONIZAÇÃO DA ESTIRPE SELVAGEM E DA ESTIRPE MH05 (AmpG)**



Padrão de colonização das estirpe mutante MHS05 (barra cinza claro) e da estirpe selvagem (barra cinza escuro) 1 e 3 dia após a inoculação. Os ensaios foram realizados em plantas de milho e a unidade utilizada foi Unidades Formadora de Colônia (UFC)/ grama (g) de raiz. Asteriscos indicam a diferenças estatísticas significativas entre as estirpes (Teste *t* Student) \*  $P \leq 0,005$ , \*\*  $P \leq 0,01$ . Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

**FIGURA 18 – PADRÃO DE ADESÃO DA ESTIRPE SELVAGEM E DA ESTIRPE MH05 NA PRESENÇA DE *N*-acetilglucosamina**



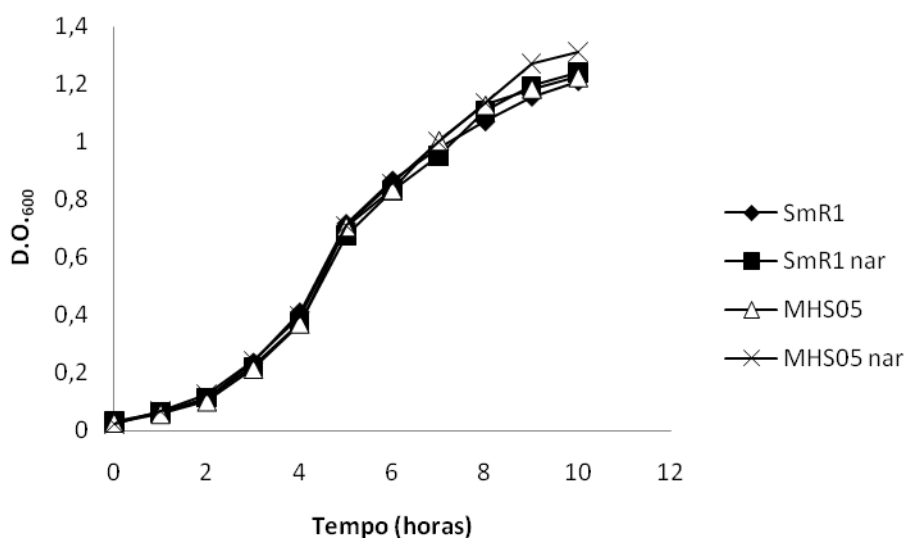
Padrão de adesão das estirpe mutante MHS05 e da estirpe selvagem na presença e ausência de *N*-acetil-glucosamina (1 mg/ml). Os ensaios foram realizados em plantas de milho e a unidade utilizada foi Unidades Formadora de Colônia (UFC)/grama (g) de raiz. Asteriscos indicam a diferenças estatísticas significativas entre as estirpes (Teste *t* Student) \*  $P \leq 0,01$ . Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

## 5.6 ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MHS05 DE *H. seropedicae*

A curva de crescimento da estirpe MHS05 foi feita e comparada com a da estirpe selvagem SmR1 na presença e ausência de naringenina (50  $\mu\text{mol/L}$ ). A estirpe MHS05 possui uma mutação no gene *ampG*, e apresentou um perfil diferenciado de LPS. A proteína AmpG, que é encontrada na membrana de bactérias Gram-negativas, está relacionada com o ciclo de reciclagem de peptidoglicanos (BONECA, 2005).

Podemos observar através da curva de crescimento (Figura 19), que não há diferença de crescimento da estirpe mutante em comparação com a estirpe selvagem e que o tempo de geração de 1,37h (mutante) e 1,43h (selvagem) são muito semelhantes. É possível assim inferir que o crescimento desta estirpe não é afetado por esta mutação. Este resultado corrobora com resultados obtidos em mutantes *ampG* em *E. coli* onde o crescimento e divisão celular não foram afetados (ADIN et al., 2009).

**FIGURA 19 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE MHS05 E SELVAGEM DE *H. seropedicae***



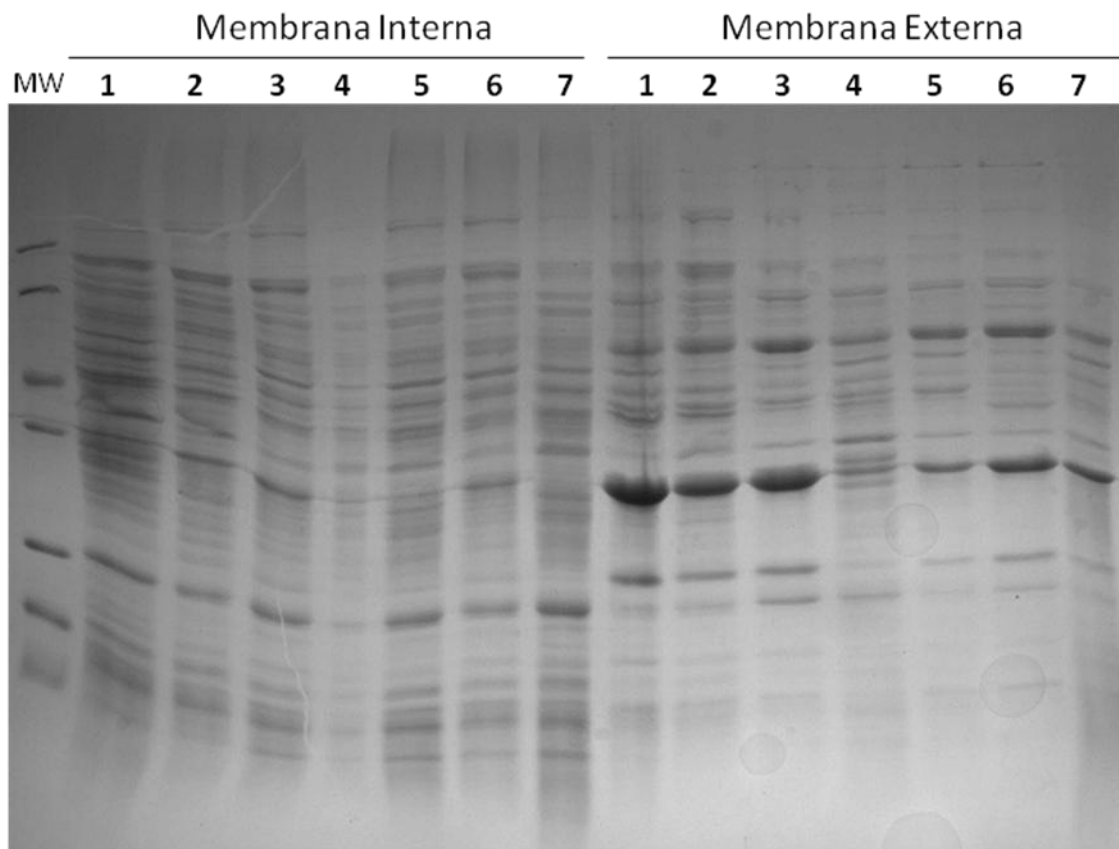
Determinação da curva de crescimento da estirpe mutante MHS05 e da estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* acompanhada durante 10 horas na presença e ausência de naringenina. As estirpes foram crescidas em meio líquido NFbHPN malato líquido. O tempo de geração estimado para a estirpe mutante foi de 1,37h e da estirpe selvagem de 1,43h.

## 5.7 ANÁLISE DE PERFIL DE MEMBRANA DAS ESTIRPES MUTANTES

Nós analisamos o perfil de membrana – envelope celular total, membrana interna e membrana externa - das estirpes mutantes cujos genes codificam para proteínas que estão envolvidas com estrutura e composição da membrana celular e da estirpe selvagem na presença e na ausência de naringenina (Figura 20). As estirpes analisadas possuem mutações em genes para a síntese de exopolissacarídeos (estirpe MHS01), uma provável proteína de membrana (estirpe MHS03), provável glicosiltransferase (estirpe MHS15) e muropeptídeo permease (estirpe MHS05).

Podemos observar que a estirpe mutante MHS03 possui o perfil de membrana externa diferente da estirpe selvagem corroborando com as análises de bioinformática indicando que a mutação seria em uma provável proteína de membrana. Mais análises precisam ser feitas para uma interpretação dos resultados.

**FIGURA 20 - PERFIL DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DA ESTIRPE SELVAGEM (SmR1) E DAS ESTIRPES MUTANTES NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NARINGENINA.**



Eletroforese SDS-PAGE da membrana interna e membrana externa isolados da estirpe parental *H. seropedicae* – SmR1 (1) sem naringenina, (2) na presença de naringenina e estirpes mutantes crescidas em meio NFbHPN-malato. (3) estirpe mutante MHS05, mucopeptídeo permease; (4) MHS03, provável proteína de membrana; (5) MHS09; (6) MHS15, provável glicosiltransferase; e (7) MHS01, síntese de exopolissacarídeos.

## 5.8 AVALIAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ INOCULADAS COM *H. SEROPEDICAE* ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES ATRAVÉS DA ANÁLISE MORFOLÓGICA E PESO SECO

As estirpes selvagem e mutantes foram submetidas a ensaios de colonização em arroz (*Oryza sativa*) e as plantas foram analisadas quanto sua morfologia e peso seco. O ensaio foi realizado vinte um dia após a inoculação e as estirpes mutantes analisadas foram as estirpes MHS01 (*epsG*), MHS05 (*ampG*) e MHS14 (*ipiAIA*). A estirpe MHS14, que possui mutação na proteína indolpiruvato ferredoxina oxirredutase, esta enzima pode estar envolvida na via de síntese de ácido indolacético (PEDROSA *et al.*, 2011), e com isto afetar o desenvolvimento das plantas.

Podemos observar que as plantas inoculadas com as estirpes MHS05 e MHS14 apresentaram um tamanho menor quando comparados com as plantas inoculadas com a estirpe selvagem SmR1 (Figura 21). Foi realizado o ensaio de peso seco das plantas (Figura 22) e o que observamos é que as estirpes mutantes MHS05 (*ampG*) afetaram o peso avaliado quando comparados com o controle não inoculado. Importante ressaltar que esta estirpe mutante apresentou uma colonização menor em plantas de milho, demonstrando novamente que este gene pode estar relacionado com o processo de interação *H. seropedicae*/planta.

A presença da estirpe selvagem SmR1, no dia avaliado, não favoreceu o crescimento da planta quando comparado com as plantas não inoculadas. Este mesmo resultado foi visualizado em outros trabalhos, onde dependendo da quantidade de células inoculadas ou ainda, mais importante, dependendo da variedade da planta analisada a resposta da planta à bactéria é alterada (ZACRYA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, no prelo; MARTIN-DIDONET, comunicação pessoal).



**FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS PLANTAS DE ARROZ INOCULADAS COM AS ESTIRPES MUTANTES E A ESTIRPE SELVAGEM DE *H. seropedicae***

**A)**



**B)**

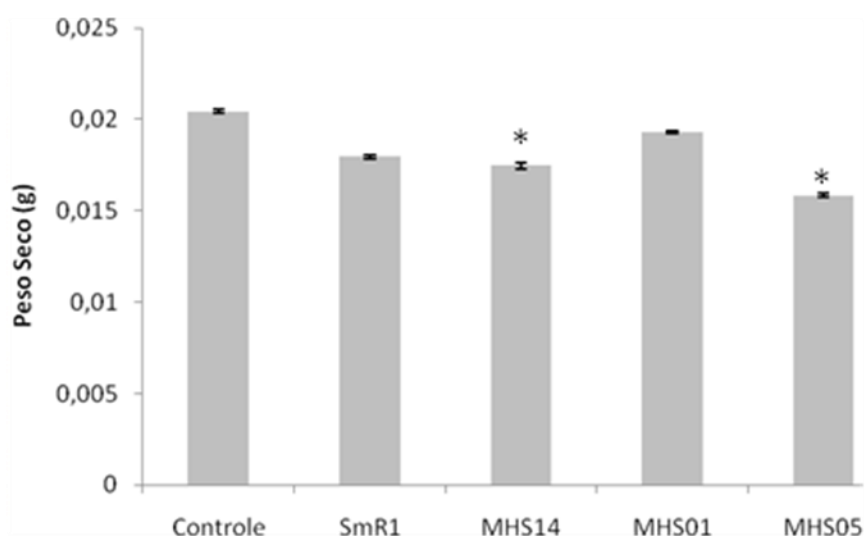


**C)**



Análise morfológica das plantas de arroz após 21 dias de colonização das estirpes mutantes MHS01 (A), MHS05 (B) e MHS14(C) e da estirpe selvagem (SmR1).

**FIGURA 22 – AVALIAÇÃO DO PESO SECO DAS PLANTAS DE ARROZ INOCULADAS COM AS ESTIRPES MUTANTES E A ESTIRPE SELVAGEM DE *H. seropedicae***



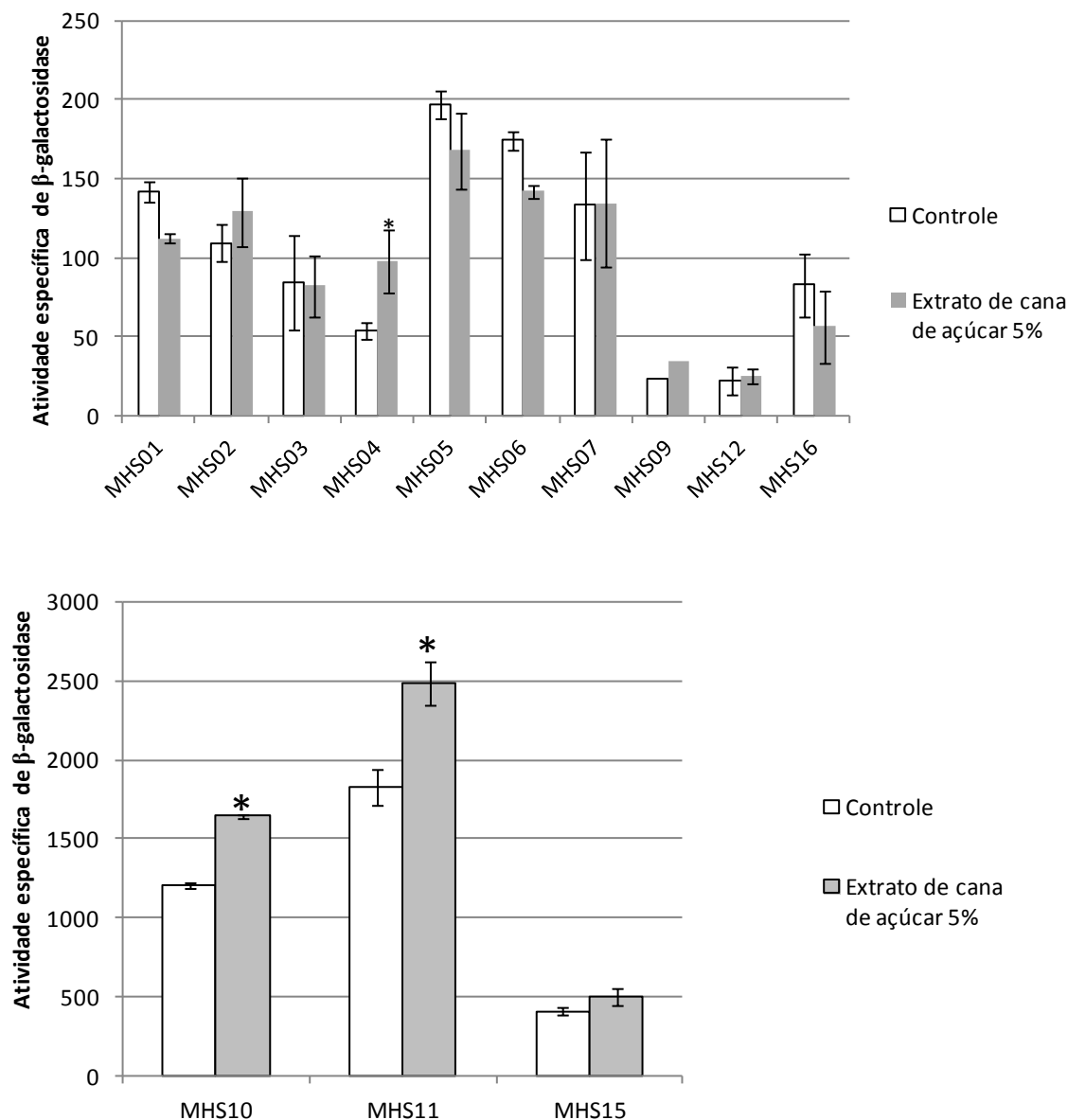
Peso seco das plantas de arroz após 21 dias de colonização das estirpes mutantes (MHS01, MHS05 E MHS14) e da estirpe selvagem (SmR1). Asteriscos indicam a diferenças estatísticas significativas entre as estirpes em relação ao controle (Teste *t* Student) \* $P \leq 0,05$ .

### **5.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DE EXTRATO DE CANA DE AÇÚCAR**

Dados da literatura demonstram que extratos de cana de açúcar podem conter um grande número de compostos fenólicos, assim como flavonóides tais como apigenina e luteolina (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Os mutantes aleatórios com expressão diferencial na presença de naringenina, foram testados na presença ou ausência de extrato de cana de açúcar 5%. As bactérias foram crescidas em 5 mL de meio líquido NFbHPN por 16 horas e depois reinoculadas em meio líquido NFbHPN suplementado ou não com extrato de cana de açúcar 5% e crescidas por 6 horas. Das 13 estirpes mutantes analisadas 11 não apresentaram

expressão diferencial de  $\beta$ -galactosidase em resposta ao extrato de cana de açúcar, 4 estirpes obtiveram expressão de  $\beta$ -galactosidase aumentada (Figura 23).

**FIGURA 23 – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE, DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*, NA PRESENÇA DE EXTRATO DE CANA DE AÇÚCAR 5%.**



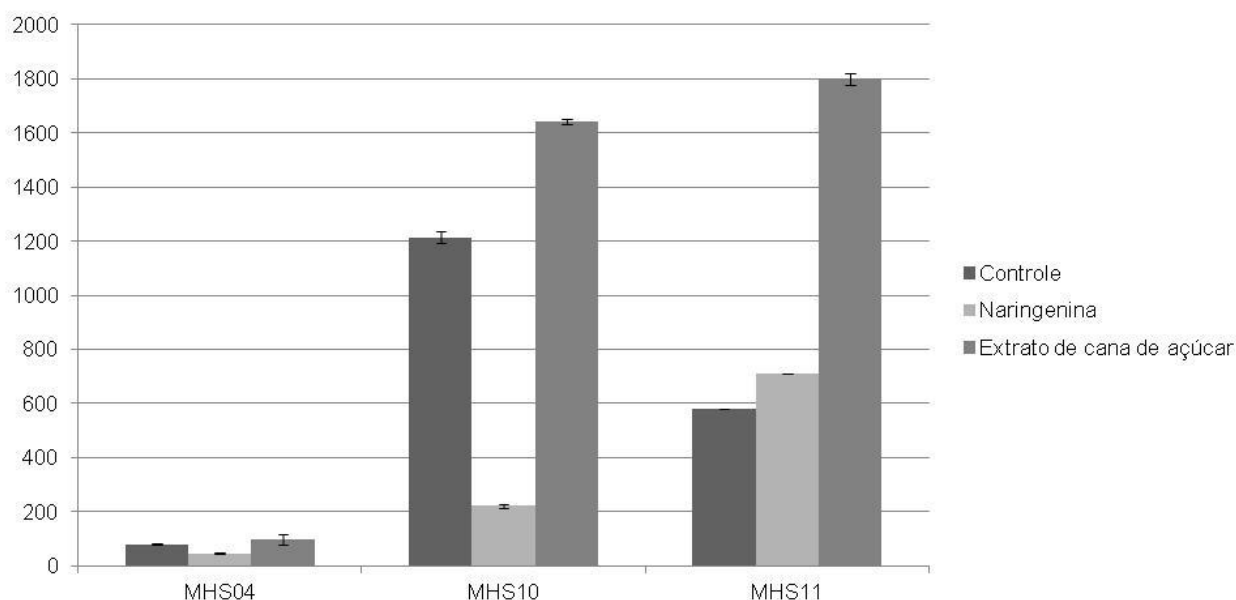
As estirpes mutantes foram cultivados em meio líquido NFbHPN malato. A condição denominada controle não contém extrato de cana de açúcar e a outra contém 5% de extrato de cana de açúcar. Asteriscos indicam a diferenças estatísticas significativas entre as condições (Teste *t* Student) \* $P \leq 0,05$ .

As estirpes mutantes que apresentaram expressão diferencial na presença de extrato de cana de açúcar foram as estirpes MHS04, MHS10 e MHS11. Estas estirpes possuem mutação em genes que codificam para uma provável aciltransferase e duas proteínas hipotéticas, respectivamente.

As estirpes MHS04 e MHS10 obtiveram um efeito antagônico comparado com o efeito da naringenina (Figura 24), na presença de naringenina a expressão é diminuída e na presença de extrato de cana de açúcar a expressão é aumentada. Este resultado é similar aos resultados encontrados para *Rhizobium* sp. NGR234 e *Sinorhizobium meliloti* onde alterando o flavonóide a ser analisado a expressão de  $\beta$ -galactosidase era alterada (KOBAYASHI et al., 2004; PECK, FISHER & LONG 2006).

A estirpe mutante MHS11 que apresentou expressão diferencial na presença de extrato de cana de açúcar similar a apresentada na presença de naringenina (Figura 24) codifica para proteína hipotética. A estirpe MHS11 que possui similaridade com proteína da família MarR e apresentou expressão aumentada na presença de ambos os compostos. Em *Bacillus subtilis* um regulador transcricional do tipo MarR, a proteína YetL, perde a capacidade de ligação ao DNA na presença de flavonóides demonstrando que estes reguladores podem ser influenciados pela presença de flavonóides (HIROOKA et al., 2009).

**FIGURA 24 – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE, DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*, NA PRESENÇA DE EXTRATO DE CANA DE AÇÚCAR 5% E NARINGENINA (50  $\mu$ mol/L).**



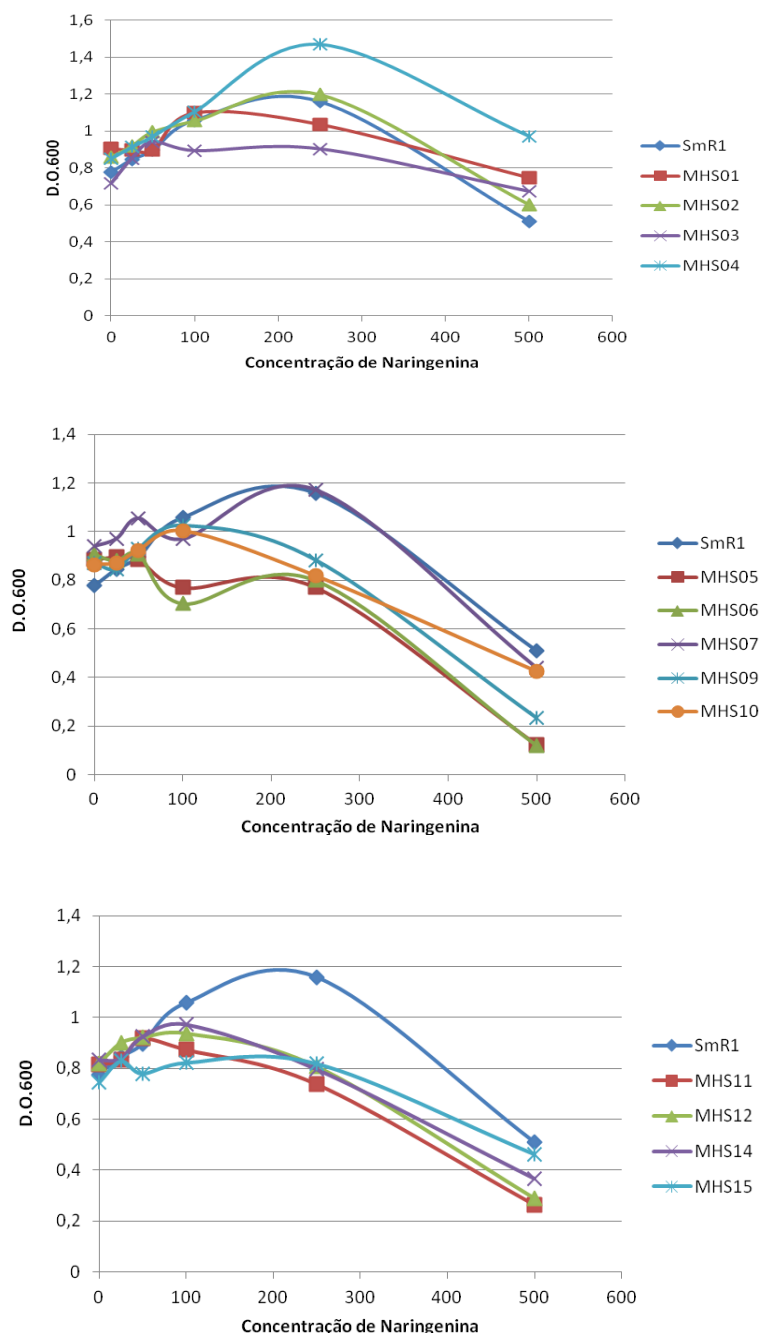
As estirpes mutantes foram cultivadas em meio líquido NFbHPN malato na presença ou ausência de naringenina (50  $\mu$ mol/L) ou extrato de cana de açúcar 5%.

#### **5.10 AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NARINGENINA**

Foi avaliado o crescimento das 16 estirpes mutantes em diferentes concentrações de naringenina em comparação com a estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae*. As bactérias foram crescidas por 6 horas em meio NFbHPN malato líquido na ausência e na presença de 25, 50, 100, 250 e 500  $\mu$ mol/L de naringenina. Podemos observar que na presença de naringenina há um estímulo do crescimento da bactéria até uma concentração de 250  $\mu$ mol/L e quando a concentração chega a 500  $\mu$ mol/L o crescimento é afetado, sendo possivelmente tóxico para algumas estirpes (Figura 25). De maneira geral todas as estirpes se comportaram de forma similar a estirpe selvagem. As estirpes que apresentaram

maior sensibilidade na presença de 500  $\mu\text{mol/L}$  de naringenina foram as estirpes MHS05, MHS06, MHS09, MHS11, MHS12 e MHS14. Estes resultados corroboram com dados da literatura onde já foi demonstrado que naringenina em concentrações acima de 250  $\mu\text{mol/L}$  podem atuar como composto antimicrobiano tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas (MANDALARI et al., 2010).

**FIGURA 25 – CRESCIMENTO DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 E DAS ESTIRPES MUTANTES NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NARINGENINA**



Crescimento das estirpes mutantes e da estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* em diferentes concentrações de naringenina. As bactérias foram crescidas durante 6 horas em meio NFbHPN malato suplementado com 25, 50, 100, 250 e 500 µmol/L de naringenina e realizado leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm.

### **5.11 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DE NARINGENINA ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL**

Estudos de PCR em Tempo Real (CHARRIER et al., 2002) foram utilizados para validar genes de expressão diferencial identificados nas análises de  $\beta$ -galactosidase.

A estirpe selvagem SmR1 foi crescida na presença de naringenina 50  $\mu\text{mol/L}$  e como controle foi utilizado meio sem naringenina, ambos em 20  $\text{mmol/L}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Este cDNA foi utilizado para análises de PCR em Tempo Real. O SYBRGreen é um corante que possui ligação altamente específica ao DNA dupla fita, capaz de detectar o produto da reação da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos de reação.

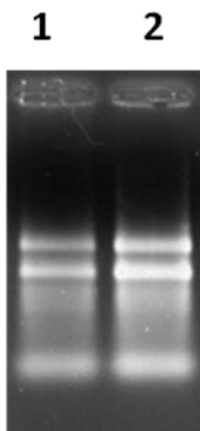
Conforme a reação de PCR se processa, a polimerase sintetiza novas cadeias a partir dos oligonucleotídeos, resultando em aumento do sinal fluorescente que é captado a cada ciclo até atingir um limiar (threshold), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência. É um ponto definido automaticamente e obrigatoriamente deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência de base (background). O limiar é definido na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde (mRNA/cDNA) amplificadas pela reação (ALEMEIDA & SADDI, 2007).

Como controle interno para PCR em Tempo Real foi utilizado o gene 16S rRNA que codifica para o RNA ribossomal de 16S. Análises preliminares indicam que este gene é expresso constitutivamente e em altos níveis em *H. seropedicae*, uma vez que na presença ou na ausência de naringenina houve amplificação próximo do ciclo 6 (Figura 27). Estes dados também indicam que a expressão



deste gene, como esperado não é alterada, independente da condição a ser analisada, corroborando a sua escolha como controle interno.

**FIGURA 26 – EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE NARINGENINA**



Gel de agarose 1% com 0,5% de  $\beta$ -mercaptaetanol para visualização de RNA total. O RNA total foi extraído utilizando trizol como metodologia. Na linha 1 temos RNA total de *H. seropedicae* crescido na ausência de naringenina e na linha 2 RNA total de *H. seropedicae* crescido na presença de naringenina.

**FIGURA 27 – GRÁFICO DE AMPLIFICAÇÃO DO cDNA 16S rRNA NAS AMOSTRAS CRESCIDAS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NARINGENINA**

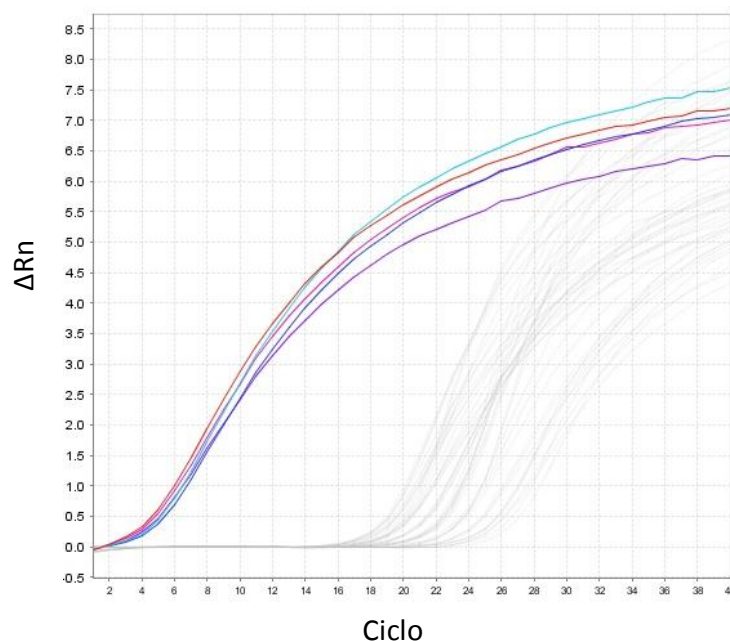


Gráfico de amplificação do gene 16S *r*RNA gerado pelo programa de análise do aparelho Step One Plus (Applied Biosystems). Os resultados estão representados pela quantificação relativa x o número de ciclos. Em tons de vermelho e rosa estão representados as replicatas da condição controle (sem naringenina) e em tons de azul estão representadas as replicatas da naringenina.

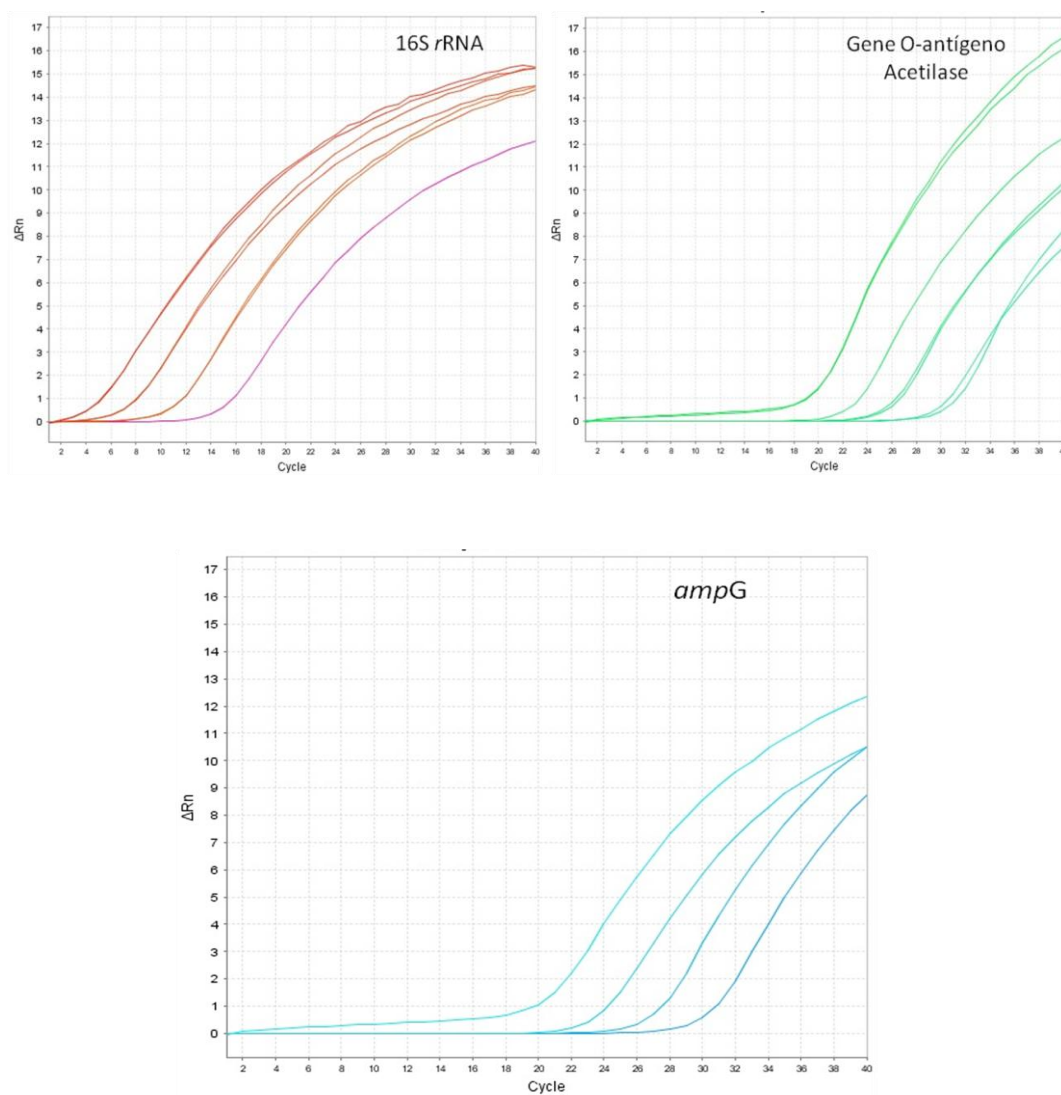
O primeiro ensaio que foi realizado foi uma Curva Padrão Relativa para verificação da eficiência e qualidade de alguns oligonucleotídeos que foram posteriormente utilizados. Foram analisados os oligonucleotídeos para o gene do 16S *r*RNA, o gene *ampG* (referente a mutação da estirpe MHS05) e de uma O-antígeno acetilase (referente a mutação da estirpe MHS02). A partir do cDNA produzido foi realizado uma diluição seriada de 1:10. Foram feitos 4 pontos a partir do cDNA diluído 10x, obtendo-se os pontos: 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001.

O programa de análises do aparelho nos mostra os resultados através de vários gráficos, o primeiro deles é o gráfico de amplificação onde temos o resultado do Sinal da fluorescência (Repórter normalizado - Rn) x o ciclo de amplificação (Figura 28). O Repórter normalizado (Rn) é a intensidade de emissão de fluorescência do corante repórter dividida pela intensidade de emissão de fluorescência do corante de referência passiva.

O segundo gráfico importante é o da Curva Padrão onde é plotado a quantidade de cDNA x Ciclo (Ct) onde houve a amplificação, e a partir deste gráfico também é possível calcular a eficiência de cada reação juntamente com o coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ) de cada curva (Figura 29).

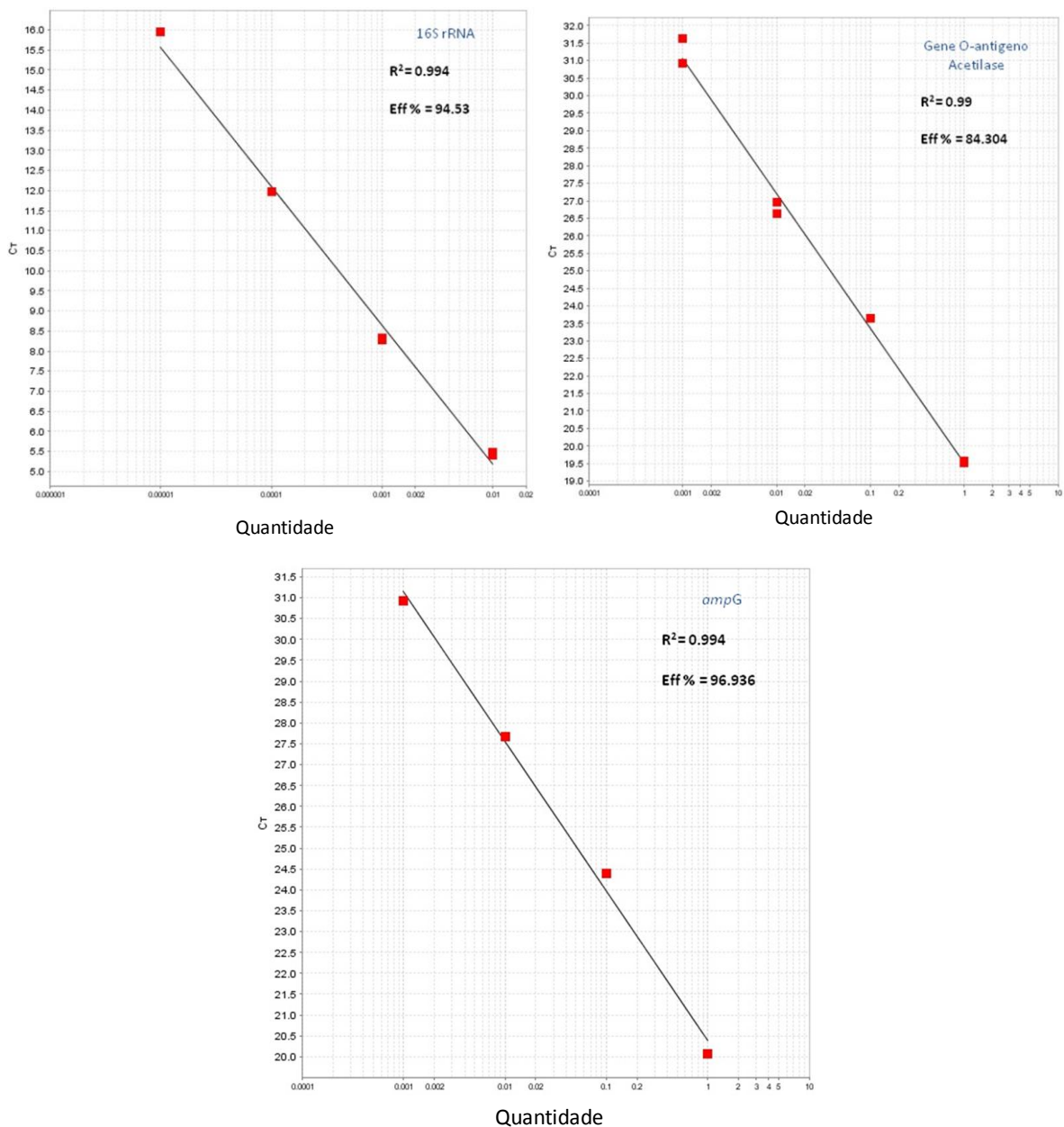
Outro fator importante a ser analisado para cada gene é a Curva de dissociação que é obtida ao final de cada corrida e nos permite visualizar se houve produtos de amplificações inespecíficos. O aparelho eleva a temperatura da corrida de 65°C a 95°C, e o que se espera que haja toda a dissociação da fita dupla intercalante do corante em apenas uma temperatura, visualizando-se assim apenas um pico de perda de sinal da fluorescência. Quando se visualiza mais de um pico significa que mais de um produto foi gerado na amplificação. Os mesmos cDNAs foram avaliados e podemos verificar que em nenhum dos casos houve amplificação considerável de produto inespecífico (Figura 30).

**FIGURA 28 – GRÁFICOS DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL DOS cDNAs 16S *r*RNA, O-ANTIGENO ACETILASE E *ampG* DE *H. serpedicae* SmR1**



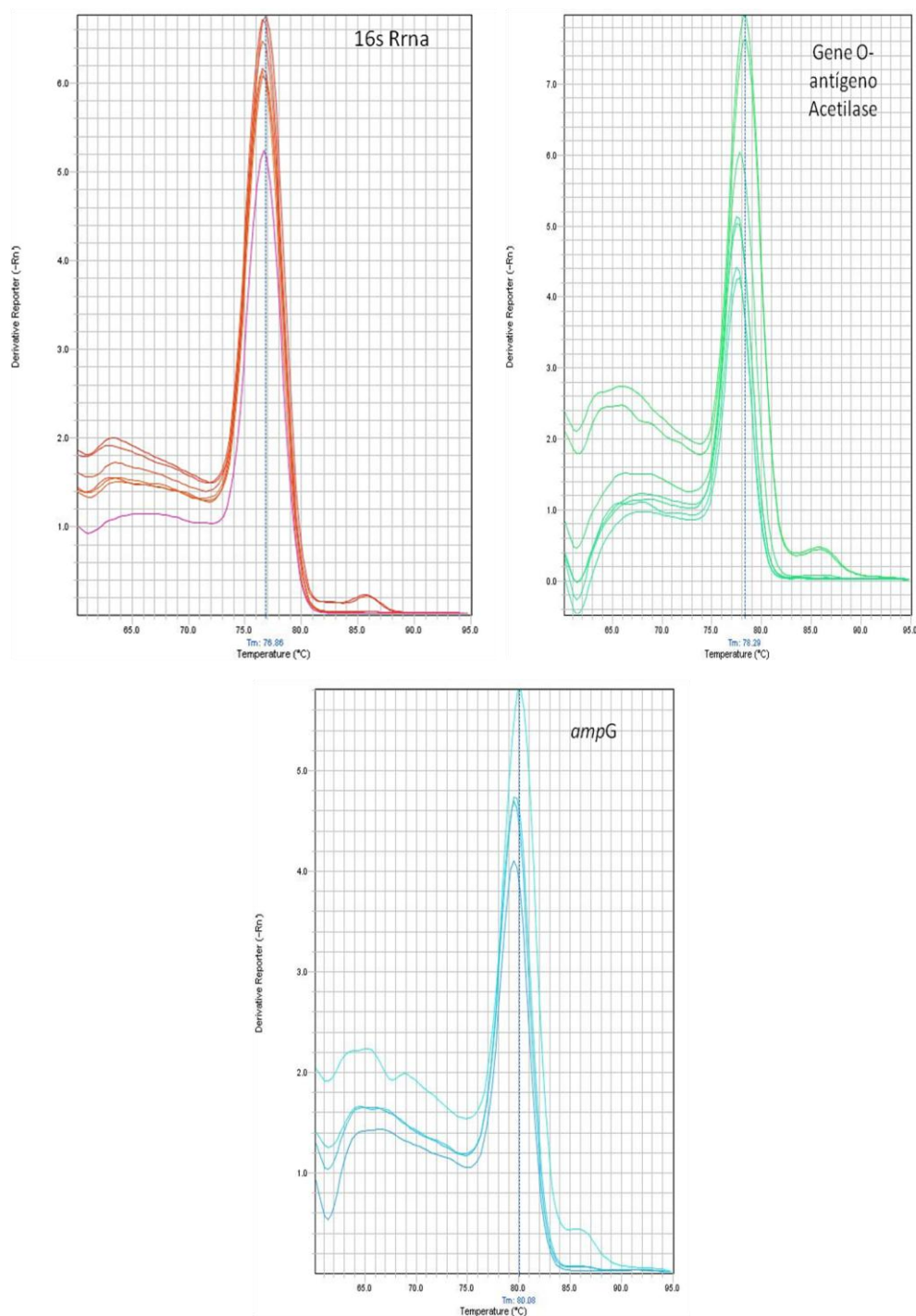
Gráficos de amplificações dos cDNAs 16S *r*RNA, O-antígeno acetilase e *ampG* gerados pelo programa de análise do aparelho Step One Plus (Applied Biosystems). Os resultados estão representados pelos valores de  $\Delta Rn$  x número de ciclos e são referentes a amostra controle (sem naringenina) em duplicata em diluição seriada 10X.

**FIGURA 29 – CURVA PADRÃO DOS cDNAs 16S *r*RNA, O-ANTIGENO ACETILASE E *ampG***



Curva Padrão dos cDNAs 16S *r*RNA, O-antígeno acetilase e *ampG* gerados pelo programa de análise do aparelho Step One Plus (Applied Biosystems). Os resultados estão representados pelos valores de Ct x quantidade de cDNA (diluições). O gráfico nos demonstra o valor de porcentagem de eficiência do oligonucleotídeo.

**FIGURA 30 – CURVAS DE DISSOCIAÇÕES DOS cDNAs 16S *r*RNA, O-ANTIGENO ACETILASE E *ampG***



Curvas de Dissociações dos cDNAs 16S *r*RNA, O-antígeno acetilase e *ampG* gerados pelo programa de análise do aparelho Step One Plus (Applied Biosystems). Os resultados são visualizados pelo gráfico  $-Rn$  x temperatura (°C).

Após verificação de que as condições das reações estavam corretos nós utilizamos o Método  $C_t$  Comparativo ( $\Delta\Delta C_t$ ) para análise da expressão gênica diferencial dos 16 genes que apresentaram expressão diferencial de  $\beta$ -galactosidase.

O método de  $C_t$  Comparativo não necessita de uma Curva padrão prévia das amostras e o resultado é dado através da Quantificação Relativa onde se emprega a seguinte fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_t}.$$

onde:  $\Delta C_t = C_t$  (alvo) -  $C_t$  (endógeno)

$\Delta\Delta C_t = C_t$  (amostra) -  $C_t$  (calibrador)

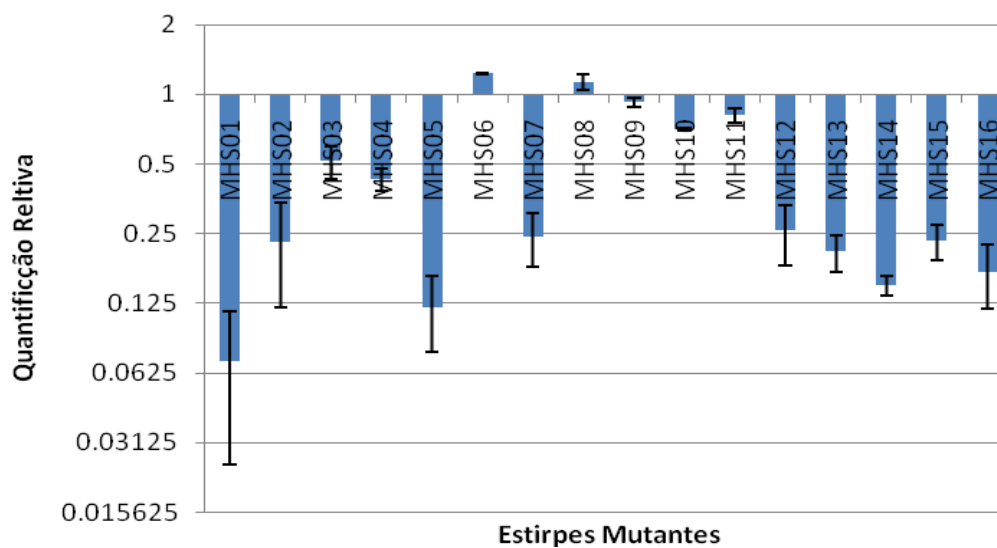
Nas nossas análises a amostra é representada pela condição de crescimento de *H. seropedicae* na presença de naringenina e o calibrador é representado pela condição de crescimento na ausência de naringenina.

Dos 16 genes analisados, que haviam expressão diferencial de  $\beta$ -galactosidase na presença de naringenina, 13 confirmaram o padrão de expressão diferencial na presença de naringenina, através da análise de PCR em Tempo Real (Figura 31A e Tabela 08). As estirpes MHS08, MHS09 e MHS11 não apresentaram expressão diferencial através desta análise. Nestas três estirpes o ensaio de  $\beta$ -galactosidase indicavam expressão aumentada na presença de naringenina, entretanto os ensaios de PCR em tempo real indicam uma falta de regulação (MHS08 e MHS09) ou uma pequena diminuição da expressão (MHS11). Esta alteração pode indicar a possibilidade de uma regulação pós-transcricional destes genes.

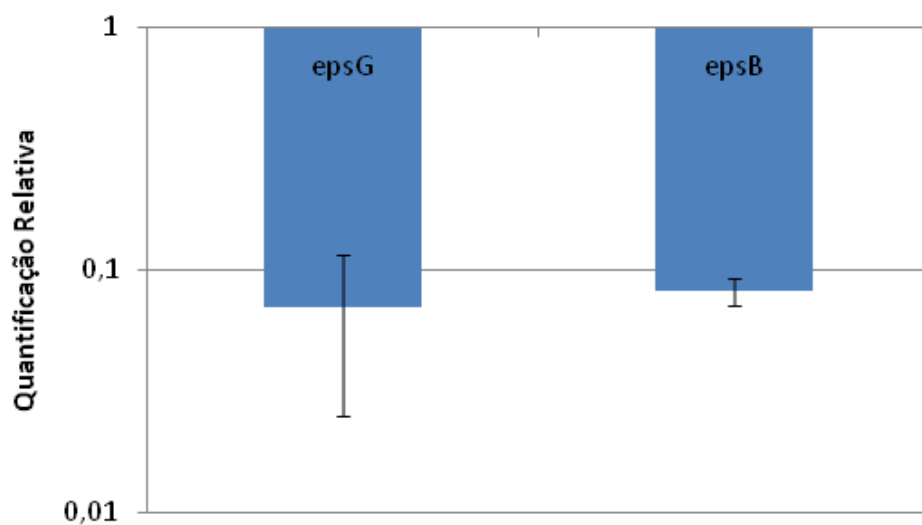
Nós também avaliamos a expressão do gene *epsB*, possivelmente pertencente ao mesmo operon que o gene mutagenizado *epsG*. Com a análise em PCR Tempo Real foi possível verificar que ambos os genes são expressos diferencialmente na presença de naringenina de forma similar, corroborando com os dados de bioinformática que nos demonstra que os genes *epsB* e *epsG* estão dispostos em um mesmo operon (Figura 31B).

**FIGURA 31 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DE NARINGENINA.**

**A)**



**B)**



Quantificação Relativa dos genes expressos diferencialmente na presença de naringenina. Os dados foram representados em escala logarítmica.



**TABELA 08 – COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DE NARINGENINA ATRAVÉS DE RT-PCR E ATIVIDADE ESPECÍFICA DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE.**

Estirpe Mutante	Produto do Gene <sup>a</sup>	Regulação por Naringenina (atividade específica – fusão <i>lacZ</i> ) <sup>b</sup>	Regulação por Naringenina (Quantificação Relativa – RT-PCR) <sup>c</sup>
MHS01	Proteína de Biosíntese de EPS (EpsG)	Expressão diminuída (0.31 $\pm$ 0.05)	Expressão diminuída (0.07 $\pm$ 0.045)
MHS02	Provável O-antígeno acetilase	Expressão diminuída (0.34 $\pm$ 0.09)	Expressão diminuída (0.23 $\pm$ 0.11)
MHS03	Proteína Hipotética Conservada	Expressão diminuída (0.5 $\pm$ 0.01)	Expressão diminuída (0.515 $\pm$ 0.082)
MHS04	Provável Aciltransferase	Expressão diminuída (0.44 $\pm$ 0.07)	Expressão diminuída (0.43 $\pm$ 0.047)
MHS05	Provável muropeptídeo permease (AmpG)	Expressão diminuída (0.33 $\pm$ 0.05)	Expressão diminuída (0.12 $\pm$ 0.043)
MHS06	Provável acil CoA:acetato/3-ceetoacido CoA transferase, subunidade beta	Expressão aumentada (1.65 $\pm$ 0.21)	Expressão aumentada (1.229 $\pm$ 0.012)
MHS07	Provável tRNA metiltransferase (TrmU)	Expressão diminuída (0.66 $\pm$ 0.11)	Expressão diminuída (0.243 $\pm$ 0.063)
MHS08	Proteína hipotética	Expressão aumentada (1.66 $\pm$ 0.007)	Expressão aumentada (1.13 $\pm$ 0.09)
MHS09	Provável ácido 5-aminolevulinico sintase	Expressão aumentada (2.04 $\pm$ 0.03)	Expressão diminuída (0.925 $\pm$ 0.046)
MHS10	Proteína hipotética	Expressão diminuída (0.18 $\pm$ 0.001)	Expressão diminuída (0.71 $\pm$ 0.01)
MHS11	Proteína Hipotética Conservada	Expressão aumentada (1.22 $\pm$ 0.015)	Expressão diminuída (0.811 $\pm$ 0.056)
MHS12	Provável NAD-dependente aldeído desidrogenase	Expressão diminuída (0.27 $\pm$ 0.03)	Expressão diminuída (0.258 $\pm$ 0.075)
MHS13	Proteína hipotética	Expressão diminuída (0.54 $\pm$ 0.12)	Expressão diminuída (0.209 $\pm$ 0.038)
MHS14	Provável indolepiruvato ferredoxina oxidoreductase, subunidades $\alpha$ e $\beta$	Expressão diminuída (0.042 $\pm$ 0.02)	Expressão diminuída (0.15 $\pm$ 0.015)
MHS15	Provável glicosiltransferase	Expressão diminuída (0.54 $\pm$ 0.006)	Expressão diminuída (0.233 $\pm$ 0.04)
MHS16	Proteína Hipotética Conservada	Expressão diminuída (0.12 $\pm$ 0.04)	Expressão diminuída (0.171 $\pm$ 0.053)

Dezesseis estirpes mutantes com expressão diferencial na presença de naringenina

<sup>a</sup> Comparação das sequências dos mutantes com banco de dados geral BLASTn

<sup>b</sup> Expressão obtida através da atividade específica de  $\beta$ -galactosidase razão da atividade na presença de naringenina / atividade na ausência de naringenina

<sup>c</sup> Quantificação Relativa obtida através de RT-PCR.

Os resultados representam triplicatas de experimentos.

## 5.12 TRANSCRIPTOMA

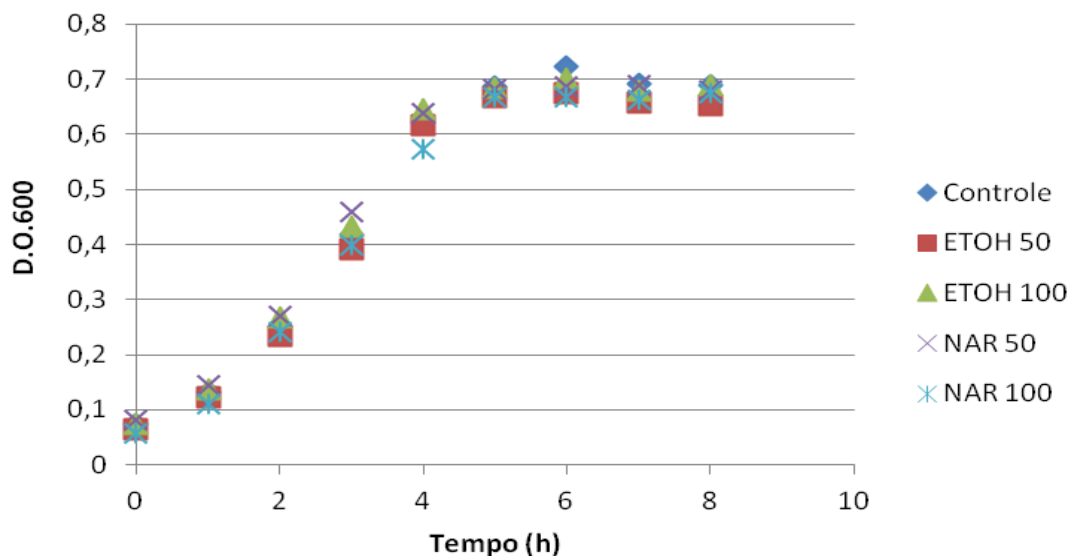
Para realizarmos o ensaio de transcriptoma precisávamos determinar qual a condição de crescimento que seria feito o ensaio para isso foram realizados curvas de crescimento da estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* na presença de duas concentrações de naringenina (50 e 100  $\mu\text{mol/L}$ ). Como controle foi utilizado meio sem naringenina e ainda meio contendo a mesma proporção de etanol 80% utilizada para diluir o flavonóide.

Além de duas concentrações do flavonóide naringenina também foi avaliado duas concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2  $\text{mmol/L}$  – Figura 32A e 20  $\text{mmol/L}$  – Figura 32B). Podemos observar pelos tempos de geração (Tabela 09) que não há diferença de crescimento da estirpe selvagem em todas as condições testadas. Ocorreu diferença no tempo de crescimento na presença de 2  $\text{mmol/L}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , onde a bactéria cresce somente até 5 horas e em 20  $\text{mmol/L}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  onde a bactéria cresce até 10 horas.

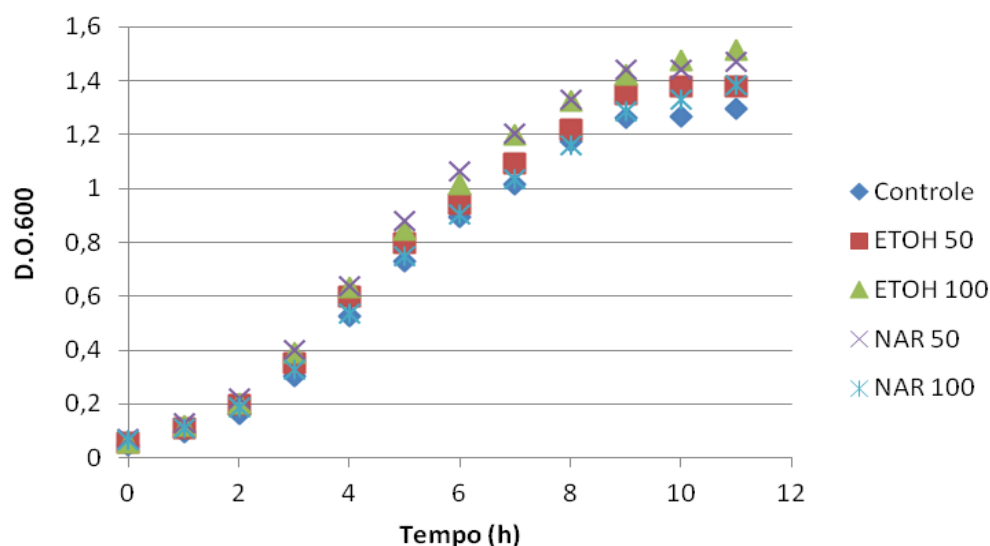
A partir das análises das curvas de crescimento escolhemos a concentração de 100  $\mu\text{mol/L}$  de naringenina com 20  $\text{mmol/L}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  após 6 horas de crescimento para os ensaios de transcriptoma.

**FIGURA 32 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE SELVAGEM SmR1 DE *H. seropedicae* COM 2 mmol/L E 20 mmol/L DE  $\text{NH}_4\text{Cl}$**

**A)**



**B)**



Determinação da curva de crescimento da estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae*. A estirpe foi crescida em meio NFbHP malato líquido com 2 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (A) e 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (B). Controle – NFbHP com 2 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; ETOH50 - acréscimo de etanol 80% na mesma proporção de naringenina 50; ETOH100 - acréscimo de etanol 80% na mesma proporção de naringenina 100; NAR50 – naringenina 50  $\mu\text{mol/L}$ ; e NAR100 naringenina 100  $\mu\text{mol/L}$ .

A estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* foi crescida durante 6 horas na presença de naringenina 100 µmol/L e como controle foi utilizado meio sem naringenina, ambos em 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl. O RNA total foi extraído utilizando-se kit RiboPure (Ambiom) e o RNA ribossomal foi depletado utilizando-se o kit MicrobExpress (Ambion) (Figura 33).

Foram realizadas duas corridas no SOLiD (Life Technologies), sendo primeiramente feitas duas amostras Controles e duas amostras na presença de naringenina e posteriormente feita mais uma corrida com a amostra na presença de naringenina. Com os dados da primeira corrida foi possível avaliar que apenas uma depleção de rRNA, a partir de 10 µg de RNA total, não havia sido suficiente para eliminar os RNAs ribossomais, uma vez que obtivemos em torno de 6% das leituras mapeadas como únicos e sem os RNA ribossomais (Tabela 10). Para a segunda corrida nós partimos de 7 µg de RNA total, para primeira depleção e obtivemos 1,5 µg de RNA depletado de rRNA. Todo este RNA depletado passou por mais uma etapa de depleção que resultou em 800 ng de RNA depletado de rRNA.

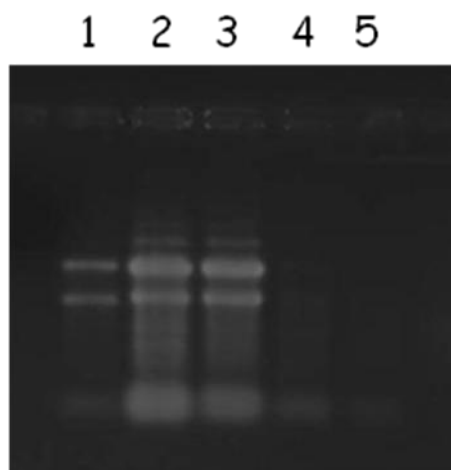
No primeiro experimento foram obtidos 76,7 milhões de leituras, para a amostra controle e 48,3 milhões de leituras para Naringenina, destas 59,7 milhões e 36,1 milhões foram mapeadas contra o genoma de *H. seropedicae*, respectivamente. Foram obtidos 3,9 milhões de leituras únicas para o Controle e 2,6 para Naringenina, somando as duas replicatas biológicas. Para segunda corrida foram obtidos 13,3 milhões de leituras, sendo destes 10,6 milhões foram mapeados e 1,3 milhões são leituras únicas, ou seja, não está incluso os rRNAs (Tabela 10).

**TABELA 09 – TEMPO DE GERAÇÃO DA ESTIRPE SELVAGEM EM DUAS CONCENTRAÇÕES DE NH<sub>4</sub>Cl**

CONDIÇÃO	NH <sub>4</sub> Cl (2 mmol/L)	NH <sub>4</sub> Cl (20 mmol/L)
CONTROLE	1,35	1,32
ETANOL 50	1,29	1,36
ETANOL 100	1,35	1,37
NARINGENINA (50 µmol/L)	1,4	1,4
NARINGENINA (100 µmol/L)	1,27	1,41

Tempo de geração em horas estimado a partir dos gráficos das Curvas de Crescimento variando as concentrações de NH<sub>4</sub>Cl, naringenina e quantidade de etanol 80%.

**FIGURA 33 – EXTRAÇÃO RNA TOTAL E RNA DEPLETADO NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE NARINGENINA**



Gel de agarose 1% com 0,5% de β-mercaptaetanol para visualização de RNA total. O RNA total foi extraído utilizando kit RiboPure (Ambion) e RNA ribossomal foi depletado utilizando-se kit MicrobExpress (Ambion). Na linha 1 temos controle do kit; linha 2 RNA total de *H. seropedicae* crescido na ausência de naringenina (controle); 3 RNA total de *H. seropedicae* crescido na presença de naringenina; 4 RNA depletado da amostra controle; e 5 RNA depletado da amostra com naringenina.

**TABELA 10 - SEQUÊNCIAS OBTIDAS DAS BIBLIOTECAS TRANSCRIPTÔMICAS**

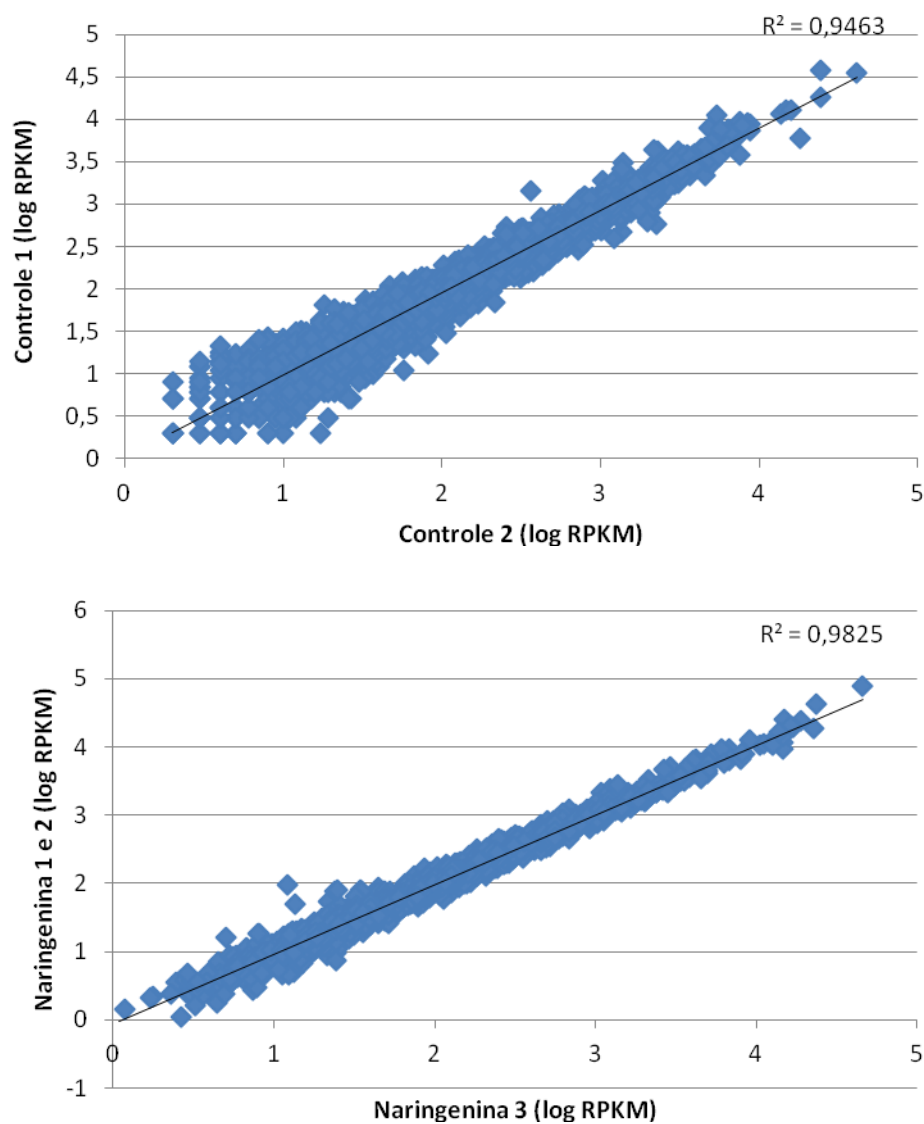
<b>Amostra</b>	<b>Número de leituras totais</b>	<b>Número de leituras Mapeadas</b>	<b>Número de leituras únicas</b>
Controle 1	35.470,533	26.723,519	2.099,431 (5,9%)
Controle 2	31.244,366	23.050,644	1.892,017 (6,1%)
Naringenina 1	15.084,728	11.231,142	968,916 (6,4%)
Naringenina 2	33.197,537	24.953,360	1.646,277 (5%)
Naringenina 3	13.258,148	10.606,518	1.270,462 (9,6%)

As amostras foram mapeadas utilizando o programa SHRIMP 2.1.1. As amostras Controles e as Naringeninas 1 e 2 foram realizadas em uma corrida distinta da Naringenina 3.

Quando se utiliza o RNA-seq para estimar a expressão gênica, as contagens de *reads* (leitura dos fragmentos sequenciados) precisam ser devidamente normalizadas para estimar significativamente a expressão (MORTAZAVI et al., 2008). A medida do total de reads por kilobase do gene mapeado por milhão de *reads* mapeada (RPKM - *reads per kilobase of transcript per million mapped reads*) normaliza a contagem de *reads* por transcrito, pelo tamanho do gene e pelo total de leituras mapeadas na amostra (MORTAZAVI et al., 2008). Sendo assim, para estimar a relação entre as amostras primeiramente elas foram normalizadas através do método de RPKM (item 3.18.6), e em seguida foi feita uma análise de regressão para determinar o quanto as replicatas biológicas são parecidas e quanto as amostras Controle e Naringenina diferem entre si. As amostras Controles ( $R^2 = 0,95$ ) e Naringeninas ( $R^2 = 0,98$ ) se mostraram iguais e os dados foram somados para serem comparados entre eles (Figura 34).

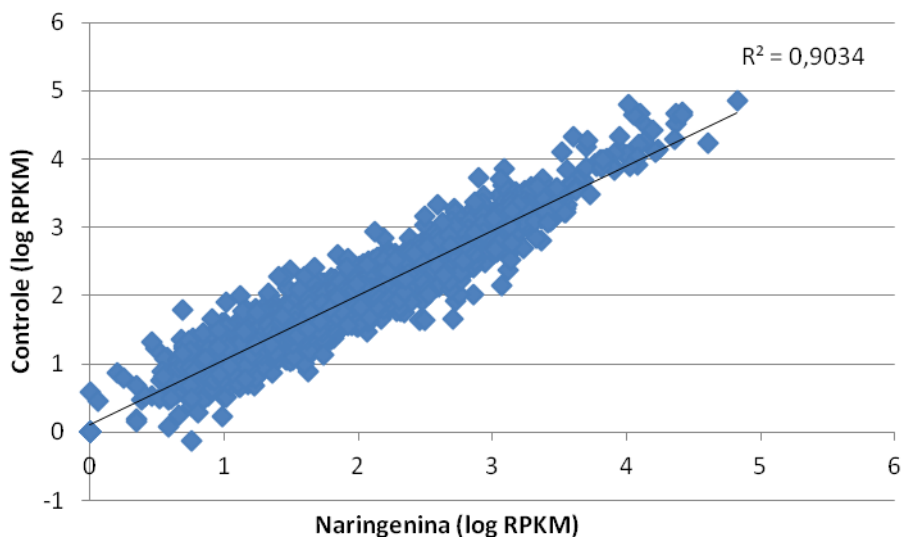
A análise de regressão da soma de todas as amostras controle em comparação com a soma de todas as amostras Naringeninas, demonstrou que elas eram diferentes entre si quando comparadas com as replicatas. O  $R^2$  obtido foi de 0,90, confirmando que há diferença entre os tratamentos (Figura 35).

**FIGURA 34 - ANÁLISE DE REGRESSÃO DAS REPLICATAS DE RNA-Seq**



Análise de regressão das replicatas da amostra controle e da amostra naringenina. Medida dada em  $\log(10)$  de *reads* por kilobase por milhão de *reads* mapeados (RPKM).

**FIGURA 35 - ANÁLISE DE REGRESSÃO ENTRE A AMOSTRA CONTROLE E AMOSTRA NARINGENINA**



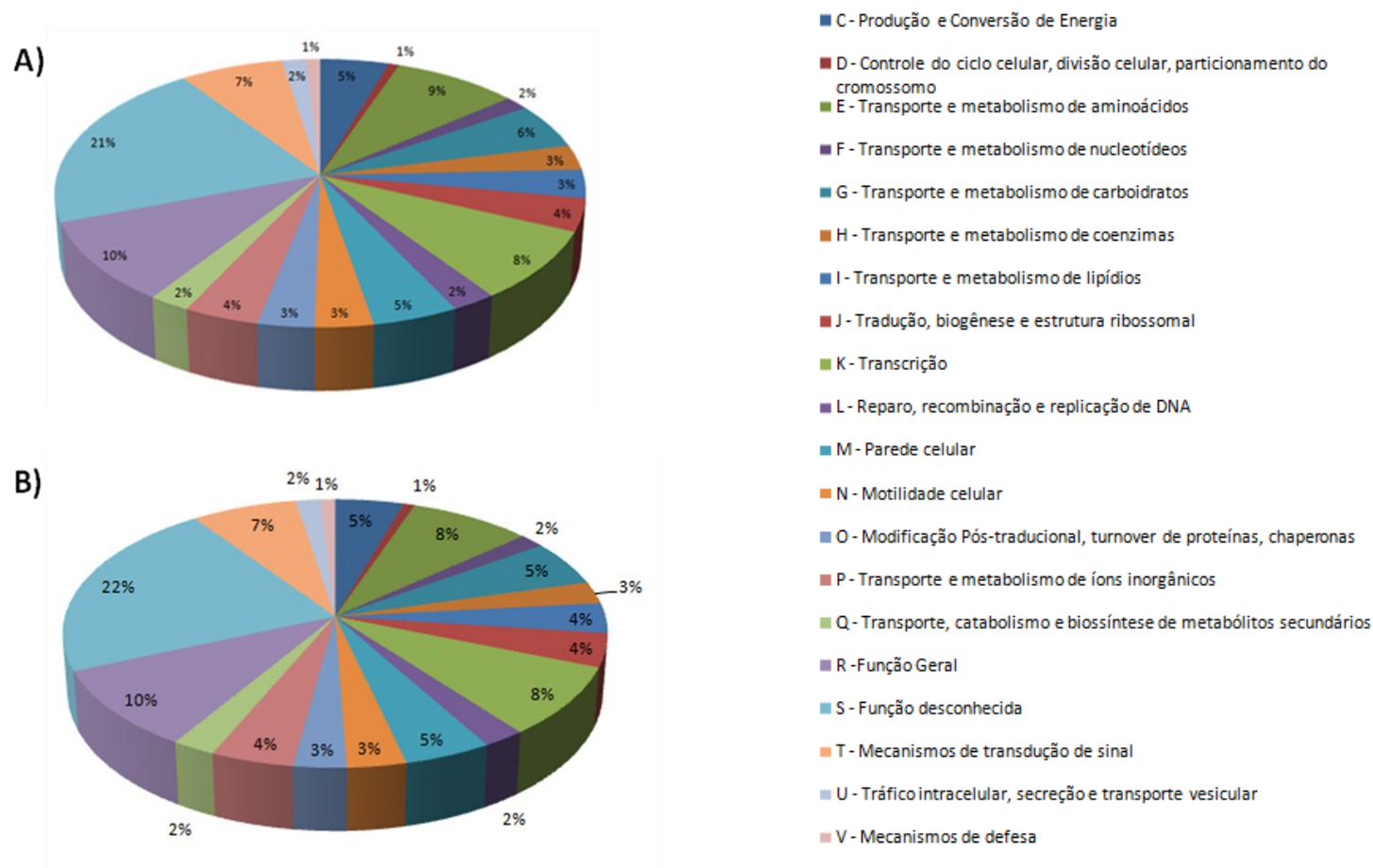
Análise de regressão da amostra controle x amostra naringenina, medida dada em  $\log(10)$  de *reads* por kilobase por milhão de *reads* mapeados (RPKM).



Após a normalização das bibliotecas, foi calculado um valor de RPKM como parâmetro de corte. Primeiramente foi realizada uma análise de expressão de cada condição. Para isso o valor de C utilizado foi de 100 porque corresponde a uma quantidade de leituras que cobriria um gene de 1.028 kb por três vezes. Este valor 1.028 kb representa o tamanho médio dos genes de *H. seropedicae*. Para a amostra controle os genes que apresentaram  $RPKM < 29,6$  foram considerados não expressos e para a amostra naringenina genes que obtiveram  $RPKM < 30,9$ . A partir deste resultado nós verificamos que dos 4.804 genes que o *H. seropedicae* possui, a amostra controle expressa 3.711 genes e a naringenina 3.672 genes.

Os genes expressos de cada amostra também foram distribuídos segundo as classes funcionais baseadas na classificação COG (**C**lusters of **O**rthologous **G**roups of proteins), que separa grupos ortólogos de proteínas, delineados pela comparação de sequência de proteínas codificadas em genomas completos, representando as principais linhagens filogenéticas. A figura 36 mostra o número de genes em cada grupo fisiológico da amostra controle e da amostra naringenina. Para essa análise foram excluídos genes com função desconhecida e genes do metabolismo de rRNA.

**FIGURA 36 - CLASSIFICAÇÃO COG DOS GENES EXPRESSOS NA AMOSTRA CONTROLE E NARINGENINA**



Porcentagem do número de genes expressos em cada categoria COG para as amostras Controle (A) e Naringenina (B).

As classificações pelo COG dos genes expressos nas amostras Controle e Naringenina foram comparadas com a classificação de todos os genes do Genoma de *H. seropedicae* e o que podemos observar é que não há diferença entre as amostras e que nenhuma delas se sobressai sobre a classificação geral do genoma (Figura 37).

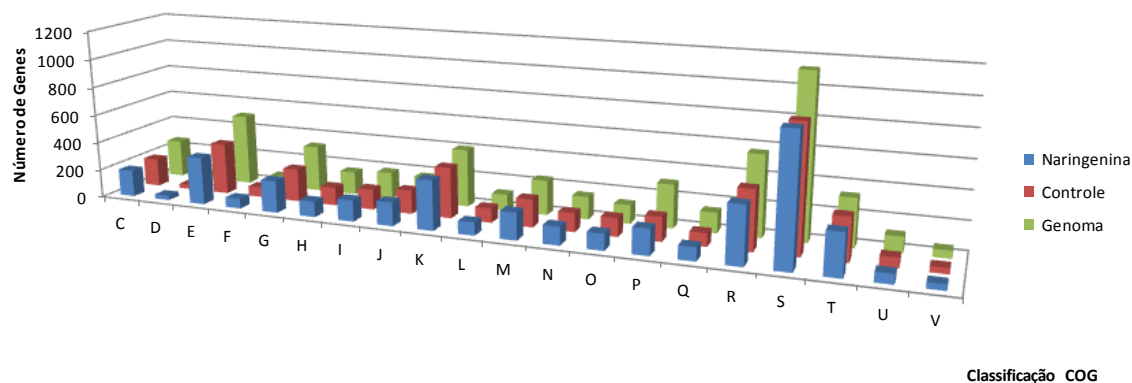
Para a análise de diferença de expressão das duas condições foi utilizado a normalização das bibliotecas e calculado um novo valor de corte de RPKM. Onde foram excluídos da amostra controle genes que apresentaram  $RPKM < 44,4$  e da amostra naringenina genes que obtiveram  $RPKM < 46,4$ .

Para o cálculo do valor de RPKM de corte foi utilizado um valor de C igual a 150 leituras. O valor de 150 foi escolhido porque corresponde a uma quantidade de leituras que cobriria um gene de 1.028kb por cinco vezes.

Considerando os genes da amostra Controle com  $RPKM > 44,4$  e da Naringenina com  $RPKM > 46,4$ , foi feita uma comparação (razão da amostra naringenina pela amostra controle) a fim de obter uma magnitude de genes ativados e reprimidos. A partir desta comparação foram selecionados das amostras os genes diferencialmente expressos como sendo aqueles ativados ou reprimidos duas vezes ou mais que a amostra controle. Sendo assim, obteve-se 336 genes de *H. seropedicae* que responderam ao flavonóide naringenina. Dentre estes, 186 genes foram reprimidos e 150 genes foram ativados. Na Figura 38 estão listados o número de genes e seu nível de expressão.

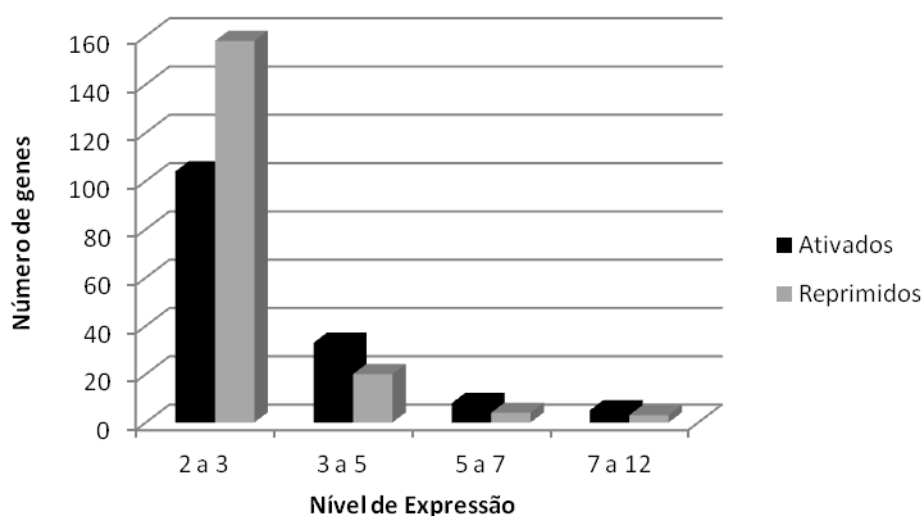
No Anexo I estão listados os genes, a razão e a classificação COG dos genes que são ativados na presença de naringenina e no Anexo II os genes reprimidos, juntamente com seu nível de expressão e classificação COG na presença de naringenina.

**FIGURA 37 – DISTRIBUIÇÃO COG DO NÚMERO DE GENES EXPRESSOS NAS AMOSTRAS CONTROLE E NARINGENINA E NO GENOMA DE *H. seropedicae***



Comparação do total de genes de *H. seropedicae* e dos genes expressos nas amostras Controle e Naringenina com a classificação COG de todos os genes de *H. seropedicae*.

**FIGURA 38 - EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE *H. seropedicae* REGULADOS POR NARINGENINA.**



Número de genes em relação a magnitude da expressão. A magnitude da expressão é calculada pela razão de RPKM da amostra naringenina / RPKM da amostra controle para os genes ativados e razão RPKM da amostra controle / RPKM da amostra naringenina para os reprimidos.

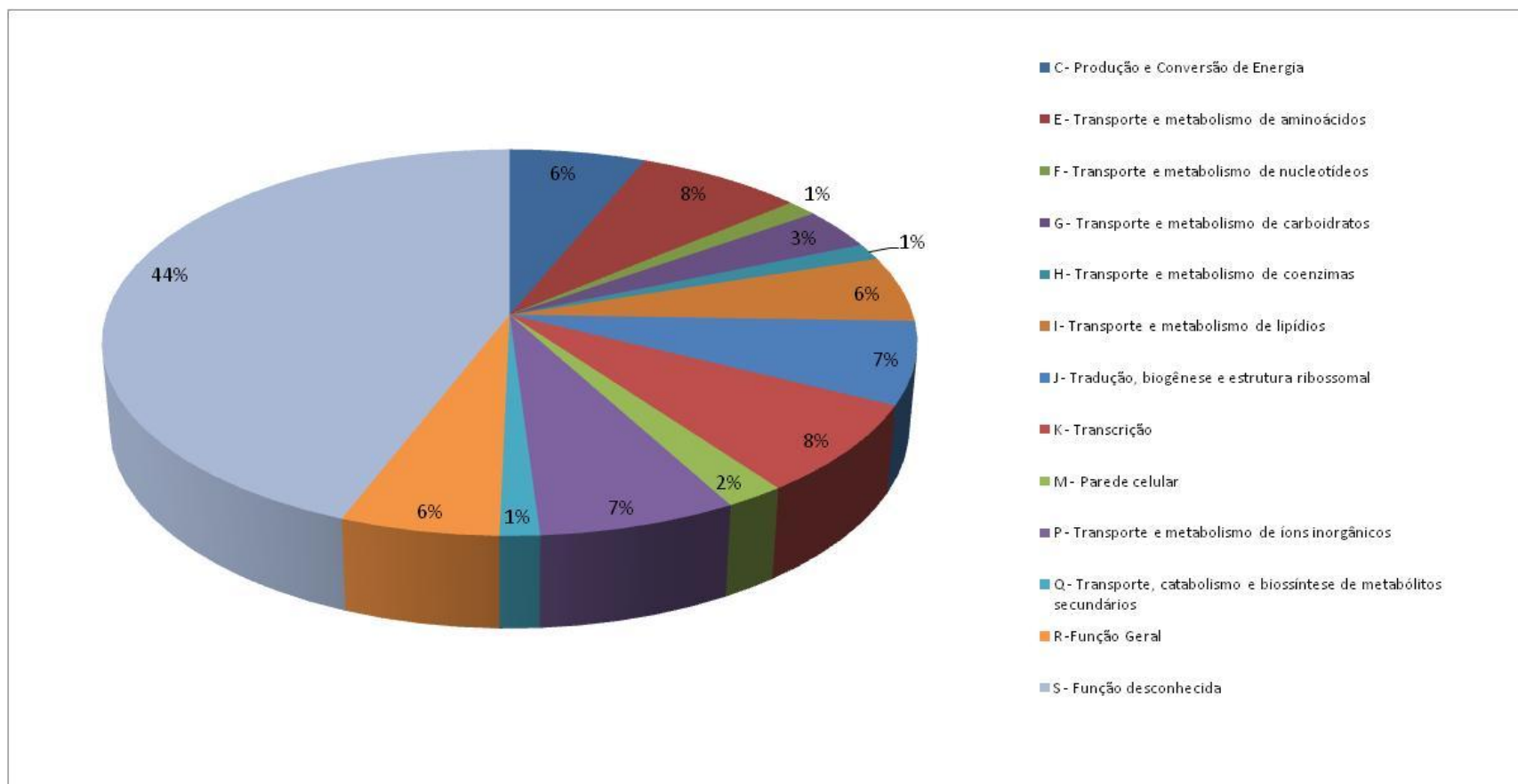
As classes de genes mais representadas, que correspondem àqueles genes, de *H. seropedicae*, que sofreram maior ativação pela presença de naringenina são: 1) função desconhecida (41%), 2) metabolismo e transporte de íons inorgânicos (8%), 3) metabolismo e transporte de aminoácidos (7%) e 4) transcrição (7%) (Figura 39).

As classes mais representadas dos genes que sofreram repressão na presença do flavonóide são: 1) metabolismo e transporte de aminoácidos (14%), 2) função desconhecida (13%), 3) Motilidade celular (12%) e 4) metabolismo e transporte de carboidratos (11%) (Figura 40).

Os genes com expressão diferencial de  $\beta$ -galactosidase na presença de naringenina também foram verificados quanto sua expressão pela análise do transcriptoma e cinco genes apresentaram o mesmo padrão de expressão diferencial que os ensaios de  $\beta$ -galactosidase e PCR em Tempo Real (Tabela 11). Dois genes que a expressão havia sido diferente do PCR em Tempo Real em relação a  $\beta$ -galactosidase, tiveram a expressão do PCR em Tempo real confirmadas, são as estirpes MHS09 e MHS11. Os demais genes no transcriptoma não apresentaram expressão diferencial na presença do flavonóide, mas é importante salientar que em sua grande maioria houve cobertura muita baixa quando comparadas com genes com expressão diferencial demonstrados no transcriptoma.

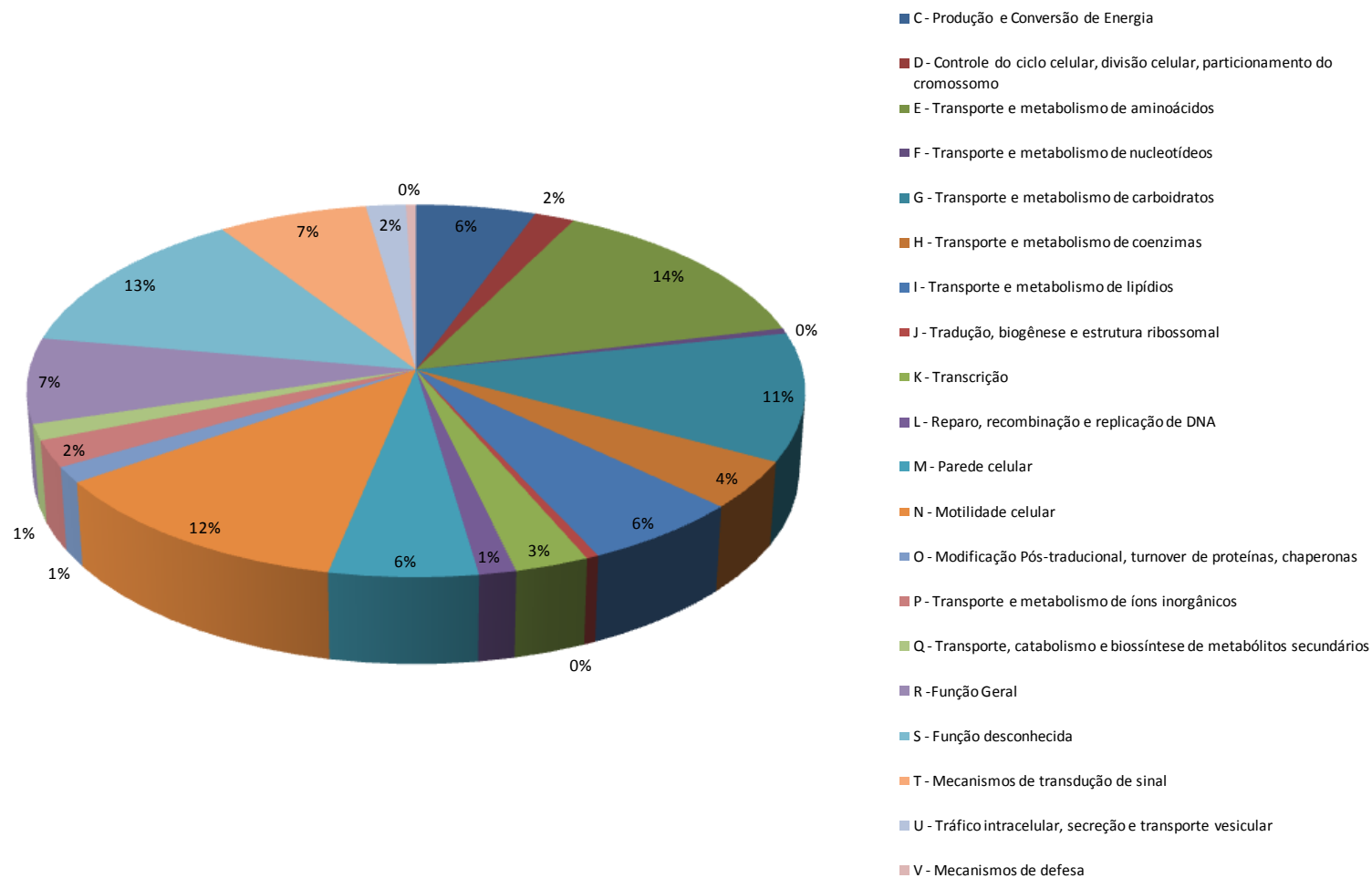
Dos genes ativados na presença de naringenina três genes *pca* possuem uma grande ativação na presença do flavonóide (7x) (Figura 41). Analisando a disposição destes genes no genoma de *H. seropedicae* podemos observar que eles estão dispostos na forma de um operon, dados da literatura demonstram que os genes *pca* estão envolvidos na degradação de compostos aromáticos através da via de degradação de protocatecoatos (Figura 43) (MACLEAN et al., 2006; SIEHLER et al., 2007; LI et al; 2010). A naringenina entraria na via de degradação de protocatecoato através de quebras e modificações na sua estrutura (Figura 42).

**FIGURA 39 - CLASSES FUNCIONAIS DE GENES ATIVADOS NA PRESENÇA DE NARINGENINA**



Classificação COG dos genes ativados na presença de naringenina. O número de genes foi representado por porcentagem.

**FIGURA 40 - CLASSES FUNCIONAIS DE GENES REPRIMIDOS NA PRESENÇA DE NARINGENINA**



Classificação COG dos genes reprimidos na presença de naringenina. O número de genes foi representado por porcentagem.

**TABELA 11 – COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DE NARINGENINA ATRAVÉS DE TRASCRIPTOMA, PCR EM TEMPO REAL E ATIVIDADE ESPECÍFICA DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE.**

Estirpe Mutante	Produto do Gene <sup>a</sup>	Regulação por Naringenina (atividade específica – fusão <i>lacZ</i> ) <sup>b</sup>	Regulação por Naringenina (Quantificação Relativa – RT-PCR) <sup>c</sup>	Regulação por Naringenina (RNA-seq) <sup>d</sup>
MHS06	Provável acil CoA:acetato/3-ceetoacido CoA transferase, subunidade beta	Expressão aumentada (1.65 $\pm$ 0.21)	Expressão aumentada (1.229 $\pm$ 0.012)	1,95
MHS08	Proteína hipotética	Expressão aumentada (1.66 $\pm$ 0.007)	Expressão aumentada (1.13 $\pm$ 0.09)	2,2
MHS09	Provável ácido 5-aminolevulinico sintase	Expressão aumentada (2.04 $\pm$ 0.03)	Expressão diminuída (0.925 $\pm$ 0.046)	0,8
MHS11	Proteína Hipotética Conservada	Expressão aumentada (1.22 $\pm$ 0.015)	Expressão diminuída (0.811 $\pm$ 0.056)	0,7
MHS12	Provável NAD-dependente aldeído desidrogenase	Expressão diminuída (0.27 $\pm$ 0.03)	Expressão diminuída (0.258 $\pm$ 0.075)	0,6
MHS13	Proteína hipotética	Expressão diminuída (0.54 $\pm$ 0.12)	Expressão diminuída (0.209 $\pm$ 0.038)	0,7
MHS14	Provável indolepiruvato ferredoxina oxidoreductase, subunidades $\alpha$ e $\beta$	Expressão diminuída (0.042 $\pm$ 0.02)	Expressão diminuída (0.15 $\pm$ 0.015)	0,4

Estirpes mutantes com expressão diferencial na presença de naringenina

<sup>a</sup> Comparação das sequências dos mutantes com banco de dados geral BLASTn

<sup>b</sup> Expressão obtida através da atividade específica de  $\beta$ -galactosidase razão da atividade na presença de naringenina / atividade na ausência de naringenina

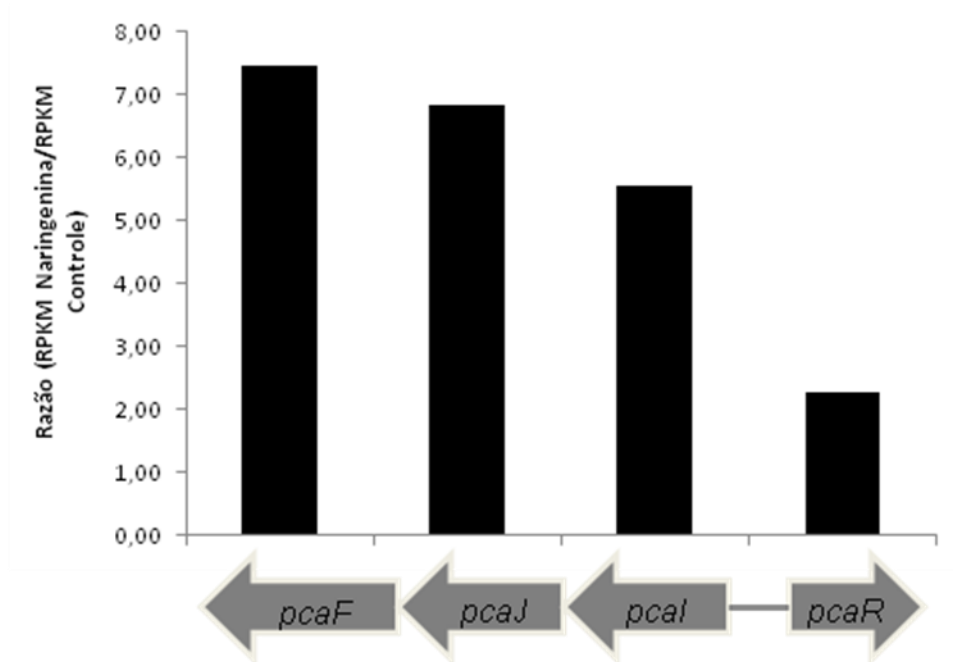
<sup>c</sup> Quantificação Relativa obtida através de RT-PCR.

<sup>d</sup> Expressão do RNA-seq dada pela razão RPKM Naringenina / RPKM Controle.

Os valores representam a média para triplicatas.

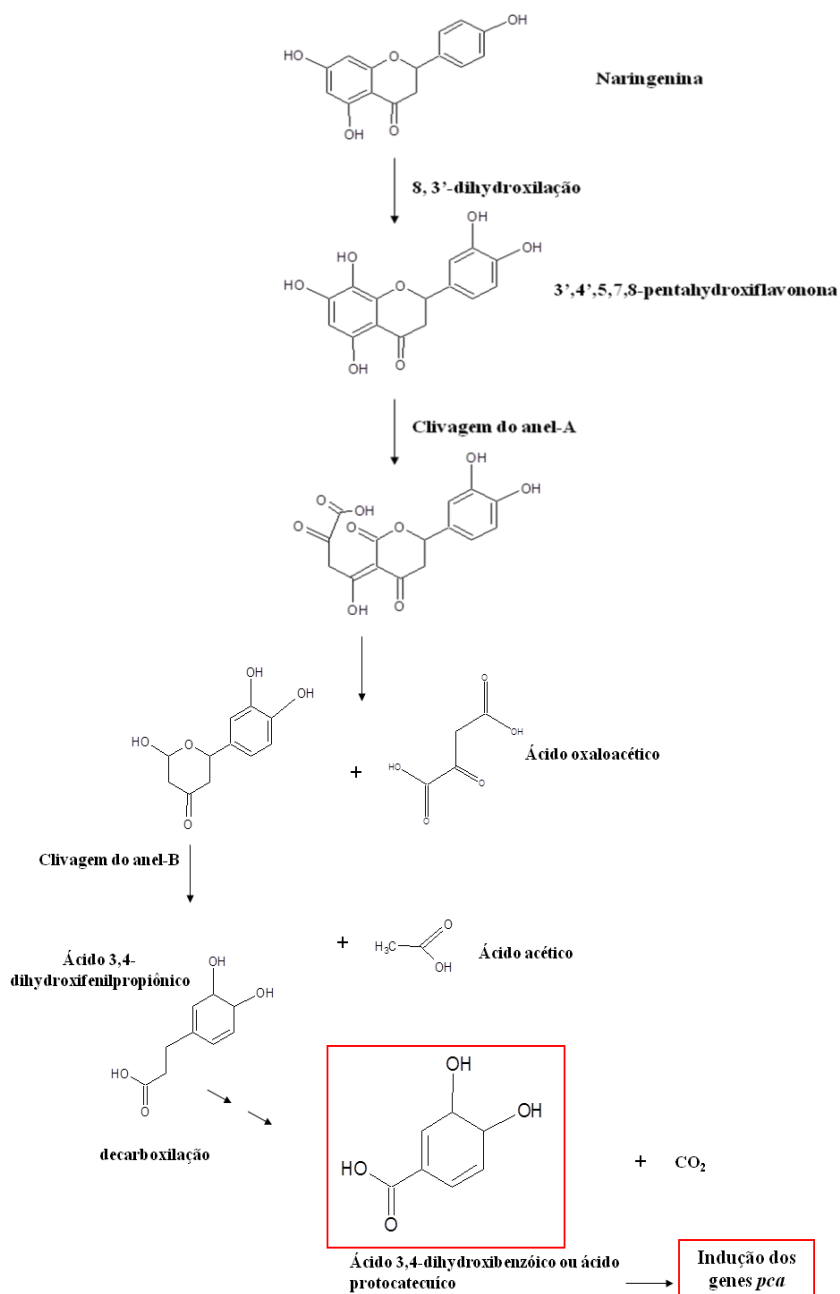


**FIGURA 41 - NÍVEL DE ATIVAÇÃO DOS GENES *pca* NA PRESENÇA DE NARINGENINA**



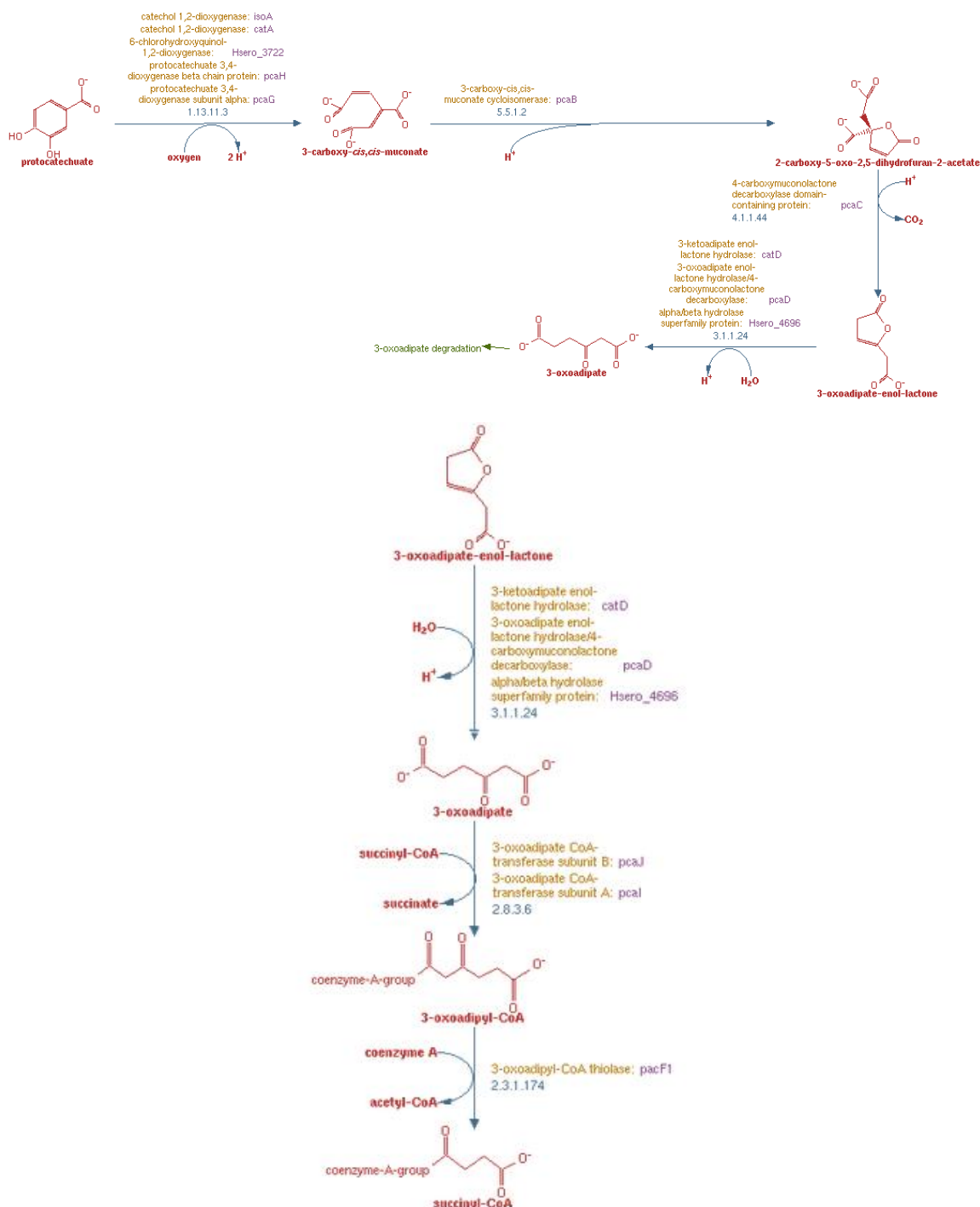
Nível da ativação do operon *pca* na presença de naringenina. Os genes estão demonstrados conforme disposição do genoma de *H. seropedicae* e o valor da ativação é dada pela razão do RPKM naringenina / RPKM controle.

**FIGURA 42 - PROVÁVEL INÍCIO DA VIA DE DEGRADAÇÃO DA NARINGENINA EM *H. seropedicae***



Via de degradação da naringenina até entrada na via de degradação do protocatecoato (indução dos genes *pca*) em *H. seropedicae* (Marin, dados não publicados).

## FIGURA 43 - ENVOLVIMENTO DOS GENES *pca* na VIA DE DEGRADAÇÃO DO PROTOCATEOCATO

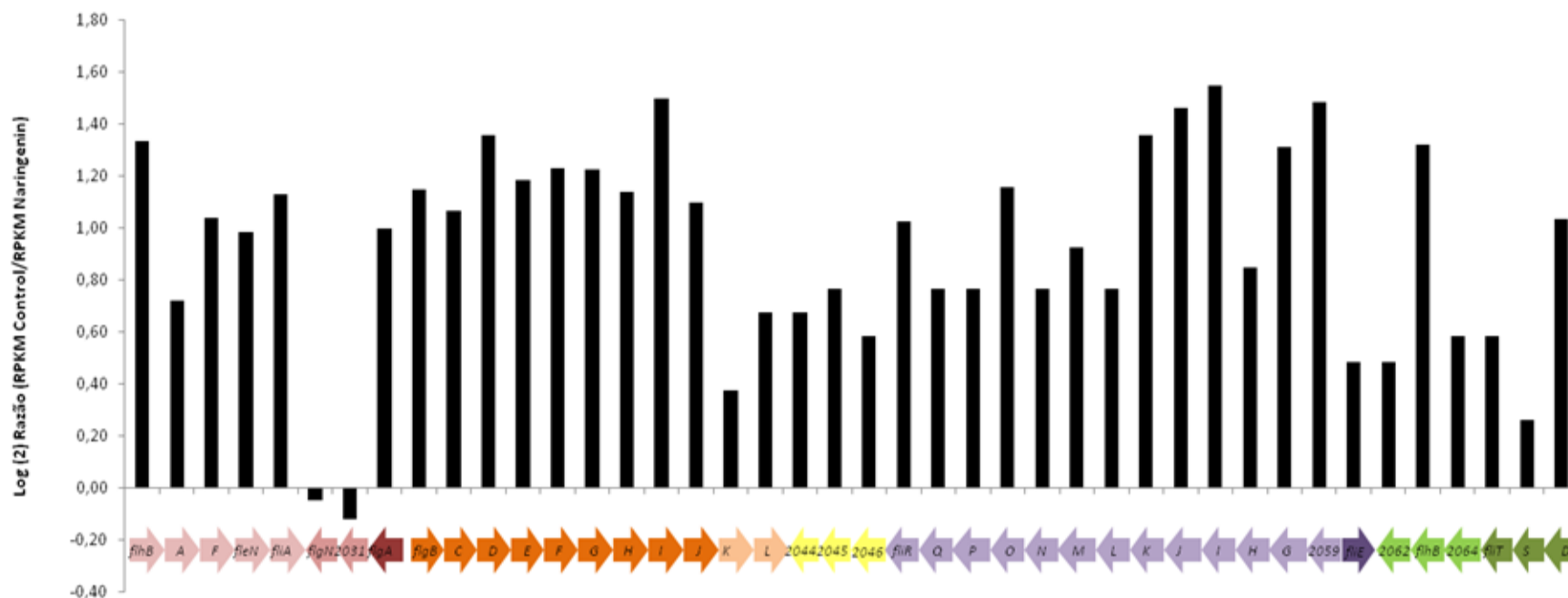


Via de degradação do protocatecoato com o envolvimento dos genes *pca*. Dados obtidos no BioCyc Database Collection, sumário do *Herbaspirillum seropedicae*, SmR1.

Quando verificamos os genes reprimidos observamos que uma classe que sobressai sobre as demais é a classe relacionada a motilidade celular (12%). O genoma de *H. seropedicae* apresenta 128 genes presentes na classe de motilidade celular. Destes, 26 (Anexo 2) apresentaram expressão diminuída na presença do flavonóide naringenina, indicando que 20% dos genes de motilidade celular de *H. seropedicae* estão reprimidos. Em *Salmonella* Typhimurium LT2 naringenina também foi capaz de reprimir genes flagelares e com isso afetar a motilidade e diminuir a adesão desta bactéria no hospedeiro (VIKRAM et al., 2011).

Foram feitas análises da região do genoma onde se encontram grande parte dos genes referentes a constituição flagelar e podemos observar que na região onde estão presentes 42 genes, se alterarmos a razão da expressão para 1,5 ao invés de 2,0, apenas 7 genes desta região não foram reprimidos na presença de naringenina (Figura 44).

**FIGURA 44 - REGIÃO DO GENOMA DE *H. seropedicae* ONDE SE ENCONTRAM OS GENES QUE CODIFICAM PARA PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO FLAGELO**



Valores da expressão na presença do flavonóide naringenina. Os valores foram calculados pelo log(2) da razão RPKM do Controle/ RPKM da naringenina. Região flagelar do genoma de *H. seropedicae*; cada cor representa um operon diferente.

Uma região importante que também está reprimida na presença de naringenina é a região dos genes *mur* que são os genes responsáveis pela biosíntese de peptidoglicano. O peptidoglicano é extremamente importante para manutenção da integridade celular e pressão osmótica e os genes *mur* estão bem descritos como importantes na sua síntese (EL ZOEIBY et al., 2001, RAMOS et al., 2003). Nós podemos observar que todo o operon onde se encontram alguns genes *mur* principais como *murD*, *murC* e *murG* estão reprimidos na presença do flavonóide (Figura 45). Nós verificamos a regulação que o gene *ampG* apresentou no transcriptoma. Este gene pode estar envolvido na reciclagem do peptidoglicano e possui expressão diminuída pelos ensaios de  $\beta$ -galactosidase e qRT-PCR na presença do flavonóide, mas os dados de transcriptoma não confirmaram este resultado. Na análise do transcriptoma ele não sofreu nenhum tipo de regulação mas este resultado pode ser explicado uma vez que a cobertura de expressão deste gene foi pequena, podendo então dificultar uma real análise deste gene pelo transcriptoma.

O transcriptoma de *H. seropedicae* na presença de naringenina nos mostrou que uma gama de genes, de diferentes funções, respondem ao flavonóide. Mais análises precisam ser feitas a fim de compreender como o metabolismo da bactéria foi afetado na presença de naringenina. Foi possível visualizar, em muitos casos, como é a transcrição de genes e operons, monstrando sítios de início e final de transcrição. Outro ponto importante é que a análise do transcriptoma também vai nos permitir fazer um refinamento da anotação genômica, nos indicando ORFs novas que ainda não foram descritas e ORFs inválidas.

[illegible]

99

## 6. CONCLUSÕES

1. A estirpe mutante MHS05 (*ampG*<sup>-</sup>) possui um perfil de lipopolissacarídeos (LPS) diferente do observado na estirpe selvagem, indicando que o produto deste gene pode estar relacionado com o metabolismo de LPS.
2. A estirpe mutante MHS05 (*ampG*<sup>-</sup>) tem uma taxa de colonização endofítica em raiz de milho 10X menor que a da estirpe selvagem, indicando que a mutação no gene *ampG*<sup>-</sup> pode causar uma alteração no processo de interação entre *H. seropedicae*/milho.
3. A estirpe mutante MHS03 (provável proteína de membrana) possui perfil protéico de membrana diferente da estirpe selvagem, indicando que esta mutação esta afetando a composição da membrana externa de *H. seropedicae*.
4. A expressão de  $\beta$ -galactosidase da estirpe mutante MHS04 (aciltransferase) na presença de extrato de cana de açúcar 5% foi antagônica a expressão na presença de naringenina. Este resultado pode indicar que além de flavonóide, outros compostos que estão presente no extrato podem alterar a expressão deste gene.
5. O crescimento das estirpes selvagem e mutantes em concentrações de naringenina acima de 500  $\mu\text{mol/L}$  é diminuída, indicando que o flavonóides pode ter um efeito antimicrobiano em determinadas concentrações.
6. Ensaios de qRT-PCR foram capazes de confirmar a expressão diferencial de determinados genes na presença de naringenina e também de confirmar que os genes *epsB* e *epsG* se encontram no mesmo operon.



7. O transcriptoma de *H. seropedicae* SmR1, na presença de naringenina permitiu a visualização de como ocorre a transcrição dos genes deste organismo.
8. Dos 4.804 genes presentes no genoma de *H. seropedicae* SmR1, 3.711 genes são expressos na condição Controle (meio NFbHPN malato, após 6 horas de crescimento – D.O.<sub>600</sub> 0,8) e 3.672 genes são expressos na presença de Naringenina (meio NFbHPN malato com 100 µmol/L de naringenina, após 6 horas de crescimento – D.O.<sub>600</sub> 0,8).
9. Considerando uma cobertura de 5x, de transcrição do gene, e um nível de expressão de no mínimo de 2x, 336 genes possuem expressão diferencial na presença de naringenina, sendo que 186 genes foram reprimidos e 150 genes foram ativados.
10. Dos 336 genes com expressão diferencial na presença de naringenina, 250 genes possuem nível de expressão de 2 a 3x, 40 genes nível de expressão de 3 a 5x e o restante de 5 a 12x, indicando que a maioria dos genes diferencialmente expressos sofre uma fina regulação na presença do flavonóide naringenina.
11. A classe de genes mais representativa nos genes ativados na presença do flavonóide é a classe com função desconhecida (41%). Nos genes reprimidos houve uma maior distribuição entre as classes que obtiveram expressão diferencial sendo que as classes: metabolismo e transporte de aminoácidos, função desconhecida, motilidade celular e metabolismo e transporte de carboidratos tiveram de 14 a 11% de representatividade.
12. O operon *pca*, envolvido na degradação de composto aromáticos através da via de degradação de protocatecoatos, encontra-se ativado na presença

de naringenina, indicando que o flavonóide pode estar sendo degradado por *H. seropedicae* através desta via.

13. Os genes reprimidos da classe de motilidade celular possuem grande representatividade quando comparados com outras classes. Observamos que a região onde se encontram os genes responsáveis pela formação flagelar há uma grande repressão induzido pelo flavonóide, isto pode indicar uma adaptação da bactéria ao ambiente em que foi exposto.
14. O transcriptoma permite um refinamento da anotação genômica, onde é possível avaliar início e final de transcrição e também validar ou não regiões genômicas transcritas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIN, D.M.; ENGLE, J.T.; GOLDMAN, W.E.; MCFALL-NGAI, M.J.; STABB, E.V. Mutations in *ampG* and lytic transglycosylase genes affect the net release of peptidoglycan monomers from *Vibrio fischeri*. **J.Bacteriol.** v.191, p. 2012–2022., 2009

AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; TSAI, S.M; PARK, Y.K. Transformações enzimáticas de flavonóides. **B. CEPPA.** v. 25, nº 01, p. 61-76, 2007.

ALBRECHT, M.; SHARMA, C.M.; REINHARDT, R.; VOGEL, J. *et al.* Deep sequencing-based discovery of the *Chlamydia trachomatis* transcriptome. **Nucleic Acids Res.** v. 38, p. 868-877, 2010

ALDON, D.; BRITO, B.; BOUCHER, C.; GENIN, S. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. **EMBO J.** v. 19(10), p.2304-14, 2000.

ALMEIDA, P.S.R.; SADDI, V.A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. *Ver. Bras. Hemoter.* v. 29, p.382-386, 2007.

ARNOLD, W.; BECKER, A.; KELLER, M.; ROXLAU, A.; PÜHLER, A. The role of *Rhizobium meliloti* surface polysaccharides in the infection of *Medicago sativa* nodules. **Endocytobiosis and Cell Research**, v. 17, p. 17-28, 1994.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology.** v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, VLD; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Selection of *Herbaspirillum* spp. strains associated with rice seedlings amended with <sup>15</sup>N-labeled fertilizer. **International Symposium on Sustainable Agriculture for the tropics - The role of Biological Nitrogen Fixation**, Angra dos Reis, Brasi, 1995.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended Description of *Herbaspirillum*, Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov., and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, p. 802-810, 1996.

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu. Rev. Plant. Biol.** v. 57, p. 233-266, 2006.

BALSANELLI, E.; SERRATO, R.V.; DE BAURA, V.A.; SASSAKI, G.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; DE SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A.; *Herbaspirillum seropedicae* *rffB* and *rffC* genes are required for maize colonization. **Environ Microbiol.** v.12, p. 2233-2244, 2010.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R.; Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**. v. 24, p. 7-11, 1998.

BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with

sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil.** v.174., p. 195-209, 1995.

BEAUME, M.; HERNANDEZ, D.; DOCQUIER, M.; DELUCINGE-VIVIER, C.; DESCOMBES, P.; FRANÇOIS, P. Orientation and expression of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small RNAs by direct multiplexed measurements using the nCounter of NanoString technology. **J. Microbiol. Methods** v. 84, p. 327-334, 2011.

BONECA, I.G. The role of peptidoglycan in pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology.** v. 8, p. 46-53, 2005.

BOTTOMLEY, P. Ecology of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. In: **Biological nitrogen fixation.** p.293-348, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.,** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, B.; ALDON, D.; BARBERIS, P.; BOUCHER, C.; GENIN, S. A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* hrp genes. **Molecular Plant Microbe Interaction.,** v. 15, p. 109-19, 2002.

BROUGHTON, W.J.; HANIN, M.; RELIÉ, B.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUÉRE, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKIN, W.J. Flavonoid-Inducible modifications to Rhamnan O Antigens are

necessary for *Rhizobium* sp. Strain NGR234-Legume symbiosis. **Journal of Bacteriology**. v. 188, n. 10, p. 3654-3663, 2006.

BUTTNER, D.; BONAS, U. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **The EMBO Journal**., v. 21, p. 5313-5322, 2002.

CAMARENA, L.; BRUNO, V.; EUSKIRCHEN, G.; POGGIO, S.; SNYDE, M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. **PLoS Pathog**. v.6: e1000834, 2010.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**. v.40, p.735-744, 2010.

CHAHBOUNE, A.; DECAFFMEYER, M.; BRASSEUR, R.; JORIS, B. Membrane topology of the *Escherichia coli* AmpG permease required for recycling of cell wall anhydromuropeptides and AmpC-lactamase induction. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 49, p.1145–1149, 2005.

CHARRIER, B.; CHAMPION, A.; HENRY, Y.; KREIS, M. Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Plant Physiol**. v. 130(2), p. 577-590, 2002.

CHEN, X.; STEWART, P.S. Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 59(6), p.718-20, 2002.

CORNELIS, G. The type III secretion injectisome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 811-825, 2006.

COSTERTON, J.W. Overview of microbial biofilms. **J Ind Microbiol**. p. 137-40, 1995.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S rDNA characterization of new nitrogen-fixing bacteria from Banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L) Merrill). **Appl. Environ. Microbiol.** v 67, p.2375-2379, 2001.

DAVID, M.; DZAMBA, M.; LISTER, D.; ILIE, L.; BRUDNO, M. SHRiMP2: Sensitive yet practical short read mapping. **Bioinformatics.** v. 27, p.1011-1012, 2011.

DENNIS, J.J.; ZYLSTRA, G.J. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 64, p.2710–2715, 1998.

DUARTE-ALEMEIDA, J.M.; NOVOA, A.V.; LINARES, A.F.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Antioxidant Activity of Phenolics Compounds From Sugar Cane (*Saccharum officinarum* L.) Juice. **Plant Foods for Human Nutrition** v. 61, p.187–192, 2006.

FERREIRA, E.P.B.; CASTRO, A.P.; DIDONET, A.D., PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R., MARTIN-DIDONET, C.C.G. Increase in grain yield of upland rice by the plant-growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* depends on the plant genotype. **Plant Soil**, no prelo.

FILIATRAULT, M.;J.; STODGHILL, P.;V.; BRONSTEIN, P.;A.; MOLL, S.; *et al.* Transcriptome analysis of *Pseudomonas syringae* identifies new genes, noncoding RNAs, and antisense activity. **J. Bacteriol.** v.192, p.2359-2372, 2010.

FINN, R.D.; MISTRY, J.; TAT, J.; COGGILL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J.E.; GAVIN, O.L.; GUNASEKARAN, P.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E.L.; EDDY, S.R., BATEMAN, A. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* v. 38, p.221-238, 2010.

FRANCIS M.S.; WOLF-WATZ, H.; FORSBERG, A. Regulation of type III secretion systems. **Curr Opin Microbiol.** v. 5, p. 166-72, 2002.

GOUGH , C.; GALERA, C.; VASSE , J.; WEBSTER, G.; COCKING, E. C.; DÉNARIÉ. J. Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** v. 10, p.560-570, 1997.

GRANT, S.G.; JESSEE, J.; BLOOM, F.R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proc Natl Acad Sci**, v. 87 (12), p. 4645- 4649, 1990.

GREEMBERG, J.T.; VINATZER, B. A., Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. **Current Opinion in Microbiology.** v. 6 , p. 20-28, 2003.

GUELL, M.; van NOORT, V.; YUS, E.; CHEN, W.;H.; et al. Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. **Science** v. 326, p. 1268-1271, 2009.

HALLMANN, J., QUADT HALLMANN, A., MAHAFFEE, W.F., KLOEPPER, J.W., Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology.** v. 43, p 895-914, 1997.

HAMILTON, T.L.; LUDWIG, M.; DIXON, R.; BOYD, E.S.; DOS SANTOS, P.C.; SETUBAL, J.C.; BRYANT D.A.; DEAN D.R.; PETERS, J.W. Transcriptional Profiling of Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. **J Bacteriol.** 193:4477-86, 2011.



HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.** v. 166 p.557-580, 1983.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry an medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics.** V. 96, p. 67-2002.

HIROOKA, K.; DANIO, Y.; HANANO, Y.; KUNIKANE, S.; MATSUOKA, H.; TOJO, S.; FUJITA, Y. Regulation of the *Bacillus subtilis* divergent yetL and yetM genes by a transcriptional repressor, YetL, in response to flavonoids. **J Bacteriol.** v. 91(11), p. 3685-3697, 2009.

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.,** v. 62, p. 379-433, 1998.

HUNGRIA, M. Sinais Moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. Revisão de Literatura **Bras. Ci. Solo.,** v.18, p. 339-364, 1994.

ISABELLA V.M.; CLARK, V.L. Deep sequencing-based analysis of the anaerobic stimulon in *Neisseria gonorrhoeae*. **BMC Genom.** v.12, 2011.

JAIN, V.; KUMAR, M.; CHATTERJI, D. ppGpp: stringent response and survival. **J. Microbiol.** v.44, p. 1–10, 2006.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany.** v. 48, p. 785-797, 1997.

JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANNETTA, P.P.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J.K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 15, p.894-906, 2002.

JENKINS, L. S.; NUNN, W.D. Regulation of the *ato* Operon by the *atoC* Gene in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** V. 169, p. 2096-2102, 1987

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.** v. 43, p. 887-891, 1997.

KOBAYASHI, H.; NACIRI-GRAVEN, Y.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of nod-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. **Mol Microbiol.** p. 335-47, 2004.

LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I.; ROUTABOUL, J-M.; BAUDRY, A.; POURCEL, L.; NESI, N.; CABOCHE, M. Genetics and Biochemistry of seed flavonoids. **Annu. Rev. Plant. Biol.** v.57, p. 405-430, 2006.

LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I.; ROUTABOUL, J-M.; BAUDRY, A.; POURCEL, L.; NESI, N.; CABOCHE, M. Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 405–430, 2006.

LEROUGE, I.; VANDERLEYDEN J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal-plant-microbe interactions. **FEMS microbiology Reviews.** v. 26, p. 17-47, 2001.

LI, D.; YAN, Y.; PING, S.; CHEN, M.; ZHANG, W.; LI, L.; LIN, W.; GENG, L.; LIU, W.; LU, W.; LIN, M. Genome-wide investigation and functional characterization of

the beta-ketoadipate pathway in the nitrogen-fixing and root-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501. **BMC Microbiol.** v.8, p.10:36, 2010.

LONG, S.R.; STASKAWICZ, B. J.; Prokaryotic plant parasites. **Cell Press.** v. 73, p. 921-935, 1993.

MACHADO, H.B; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of *nifR3*-like-*ntrB*-*ntrC* operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.** v. 41, p.674-684, 1995.

MACLEAN, A.M.; MACPHERSON, G.; ANEJA, P.; FINAN, T.M. Characterization of the  $\beta$ - Ketoadipate Pathway in *Sinorhizobium meliloti*, **App. Envir. Microbiol.** v. 72, p. 5403-5413, 2006

MANDALARI, G.; BISIGNANO, C.; D'ARRIGO, M.; GINESTRA, G.; ARENA, A.; TOMAINO, A.; WICKHAM, M.S. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. **Lett Appl Microbiol.** v. 51(1), p. 83-89, 2010.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends Genet**, v. 24, n. 3, p. 133-41, Mar 2008.

MARIE, C.; BROUGHTON W. J.; DEAKIN, W. J. Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarms. **Current Opinion in Plant Biology.** v. 4 , p. 336-342, 2001.

MARTIN, J.; ZHU, W.; PASSALACQUA, K.D.; BERGMAN, N.; BORODOVSKY, M. *Bacillus anthracis* genome organization in light of whole transcriptome sequencing. **BMC Bioinformatics** v. 11 (Suppl 3): S10, 2010.

MERCANTE, F.M.; GOI, S.R.; FRANCO, A.A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Ver. Univ. Rural.** v. 22, p.65-81, 2002.

METZKER, M.L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature Reviews Genetics** v.11, p-31-45, 2010.

MILLER, J.F.; MEKALANOS, J.J.; FALKOW, S. COORDINATE REGULATION AND SENSORY TRANSDUCTION IN THE CONTROL OF BACTERIAL VIRULENCE. **SCIENCE.** v. 243, p. 916-922, 1989.

MYLONA, P.; PAWLOSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell.** v. 7. P. 869-885. 1995.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nat. Methods** v. 5, p. 621-628, 2008.

OLIVE, H.F.; ORSI, R.H.; PONNALA, L.; KEICH, U.; WANG, W.; SUN, Q.; CARTINHO, S.W.; FILIATRAULT, M.J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Deep RNA sequencing of *L. monocytogenes* reveals overlapping and extensive stationary phase and sigma B-dependent transcriptomes, including multiple highly transcribed noncoding RNAs. **BMC Genom.** v.10, p.641, 2009.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol Microbiol.** p. 295-304, 1998.

PASSALACQUA, K.D.; VARADARAJAN, A.; ONDOV, B.D.; OKOU, D.T.; ZWICK M.E.; BERGMAN N.H. The structure and complexity of a bacterial transcriptome. **J Bacteriol** 191: 3203–3211, 2009.

PECK, M.C.; FISHER, R.F.; LONG, S.R. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. **J Bacteriol** v. 188, p. 5417–27, 2006.

PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**. v. 7(5): e1002064, 2011.

PERKINS, T.T.; KINGSLEY, R.; FOOKES, M.C.; GARDNER, P.P.; JAMES, K.D.; YU, L.; ASSEFA, S.A.; HE, M.; CROUCHER, N.J.; PICKARD, D.J.; MASKELL, D.J.; PARKHILL, J.; CHOUDHARY, J.; THOMSON, N.R.; DOUGAN, G. A strand-specific RNA-Seq analysis of the transcriptome of the typhoid bacillus *Salmonella typhi*. **PLoS Genet.** v.5, e1000569, 2009.

PIMENTEL, J. P.; OLIVAR ES, F.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae* **Plant. Soil.** v. 137, p. 61-65, 1991.

PINTO, A.C.; MELO-BARBOSA, H.P.; MIYOSHI, A.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. **Gen. Mol.Res.** v.10 (3), p. 1707-1718, 2011.

PLUMBRIDGE, J. An alternative route for recycling of N-acetylglucosamine from peptidoglycan involves the N-acetylglucosamine phosphotransferase system in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 191, p. 5641–5647, 2009.

POZIDIS, C.; CHALKIADAKI, A.; GOMEZ-SERRANO, A.; STAHLBERG, H.; BROWN, I.; TAMPAKAKI, A.P.; LUSTIG, A.; SIANIDIS, G.; POLITOU, A.S.; ENGEL, A.; PANOPOULOS, N.J.; MANSFIELD, J.; PUGSLEY, A.P.; KARAMANOU, S.; ECONOMOU, A. Type III protein translocase - Hrcn is a peripheral membrane ATPase that is activated by oligomerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 28, p. 25816-25824, 2003.

PÜHLER, A.; ARLAT, M.; BECKER, A.; GÖTTFERT, M.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, p. 137-147, 2004.

QUISPEL, A. A search of signals in endophytic microorganisms. **Molecular signals in Plant-Microbe Communications** p. 471-491, 1992.

REDDY, P.M.; REONDÓN-ANAYA, M.; SOTO DEL RÍO, M.D.; KHANDUAL, S. Flavonoids as Signaling Molecules and Regulators of Root Nodule Development. **Dynamic soil, Dynamic plant.** v. 1, n° 2, p. 83-94, 2007.

RONCATO-MACCARI, L.D.B. **Colonização de gramíneas por *Herbaspirillum seropedicae* e expressão de genes *nif* in planta.** Tese de doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, p. 944–945, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>a</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHWAB, S.; RAMOS, H.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; YATES, M.G.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U. Identification of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. **Arch. Microb.** P. 379-386, 2007.

SCHLOTTER, M.; WIEHE, W.; ASSMUS, B.; STEINDL, H.; BECKE, H.; HÖFLICH, G.; HARTMANN, A. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, p. 2038-2046, 1997.

SERRATO, R.V.; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; CRUZ L.M.; PEDROSA, F.O.; CHOUDHURY, B.; CARLSON R.W.; IACOMINI, M. Estructural characterization of an acid exoheteropolysaccharide produced by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 564-572, 2008.

SHARMA, C.M.; HOFFMANN, S.; DARFEUILLE, F.; REIGNIER, J.; et al. The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature** v. 464, p.250-255, 2010.

SHAW, L.J.; MORRIS, P.; HOOKER, J.E. Perception and modification of plant flavonoid signals rhizosphere microorganisms. **Environmental Microbiology**. V. 8, n. 11, p. 1867-1880, 2006.

SIEHLER, S.Y.; DAL, S.; FISCHER, E.; PATZ, P.; GERISCHER, U. Multiplelevel regulation of genes for PCA degradation in *Acinetobacter baylyi* includes cross-regulation. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 73, p. 232–242, 2007.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PULHER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Biotechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

SMITH, R.S. Legume inoculants formulation and application. **Can J Microbiol.**, v. 38, p. 485-492, 1992.

SNEL, B.; LEHMANN, G.; BORK, P.; HUYNEN, M.A. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. **Nucleic Acids Res**, v. 28, p. 3442–3444, 2000.

SOREK, R.; COSSART, P. Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. **Nat Rev Genet**, v. 11, n. 1, p. 9-16, Jan 2010.

SULAVIK, M.; DAZER, M.; MILLER, P.F. The *Salmonella typhimurium* mar Locus: Molecular and Genetic Analyses and Assessment of Its Role in Virulence. **J Bacteriol** v. 179, p.1857–1866, 1997.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharides in the adhesion of marine and freshwater bacteria. **Microbial Adhesion to Surfaces**. p. 329-338, 1980.

TADRA-SFEIR, M.Z. **Mutagênese aleatória e identificação de genes regulados por naringenina em *Herbaspirillum seropedicae*** Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.



TSAI, C.M.; FRASCH, C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal Biochem.** v. 119, p.115-119, 1982.

URQUIAGA, S.; CRUZ, H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 56, p.105-114, 1992.

van VLIET A.H. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 302, p.1-7, 2010.

VERMA, D.P.S. Signals in Root Nodule Organogenesis and Endocytosis of *Rhizobium*. **The Plant Cell**, v. 4, p.373-382, 1992.

VIKRAM, A.; JESUDHASAN, P.R.; JAYAPRAKASHA, G.K.; PILLAI, S.D.; JAYARAMAN, A.; PATIL, B.S. Citrus flavonoid represses *Salmonella* pathogenicity island 1 and motility in *S. Typhimurium* LT2. **Int J Food Microbiol.** v. 145(1), p.28-36, 2011.

VIPREY, V.; GRECO, A. D.; GOLINOWSKI, W.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Molecular Microbiology.** v. 26, p. 1381-1389, 1998.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, 10:57– 63, 2009

YODER-HIMES, D.R.; CHAIN, P.S.; ZHU, Y.; WURTZEL, O.; RUBIN, E.M.; TIEDJE, J.M.; SOREK, R. Mapping the *Burkholderia cenocepacia* niche response

via high-throughput sequencing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 106, p. 3976-3981, 2009.

YOUNG, J.P.W.; JOHNSTON, A.W.B. The evolution of specificity in the legume-rhizobium symbiosis. **Trends in Ecology & Evolution** v. 4, p. 341-349, 1989.

ZAKRIA, M.; NJOLOMA, J.; SAEKI, Y.; AKAO, S. Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp. strain B501 *gfp1* and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. **Microbes Environ** v. 22, p. 197-206, 2007.

# ANEXOS

## Anexo I - Genes Ativados na presença de naringenina

Gene	Nível de Expressão	Classificação COG
accB	12,81	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_0039	7,85	C - Energy production and conversion
Hsero_0903	7,62	S - Function unknown
Hsero_0038	7,48	K - Transcription
pcaI	7,45	I - Lipid transport and metabolism
pcaF	6,83	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_3135	6,70	S - Function unknown
infA	5,79	J - Translation, ribosomal structure and biogenesis
Hsero_1356	5,79	K - Transcription
Hsero_1357	5,75	M - Cell wall
Hsero_2357	5,59	S - Function unknown
pcaJ	5,56	I - Lipid transport and metabolism
ssuF	5,09	H - Coenzyme transport and metabolism
Hsero_4018	4,86	S - Function unknown
Hsero_1267	4,79	Q - Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
catC	4,62	Q - Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
mgtA	4,56	P - Inorganic ion transport and metabolism
glnP	4,53	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_4522	4,37	S - Function unknown
Hsero_1823	4,26	S - Function unknown
ntrC	4,26	T - Signal transduction mechanisms
Hsero_3494	4,13	S - Function unknown
Hsero_0898	3,92	S - Function unknown
elaB	3,87	S - Function unknown
Hsero_1491	3,75	S - Function unknown
Hsero_0037	3,62	G;E;P;R - Carbohydrate transport and metabolism;Amino acid transport and metabolism;Inorganic ion transport and metabolism;General function prediction only
exaC	3,58	C - Energy production and conversion
Hsero_3137	3,53	S - Function unknown
Hsero_2367	3,48	S - Function unknown
Hsero_1266	3,46	S - Function unknown
rplL	3,45	J - Translation, ribosomal structure and biogenesis
Hsero_0043	3,43	S - Function unknown
urtE	3,43	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_2396	3,37	S - Function unknown

Hsero_2394	3,36	S - Function unknown
Hsero_1268	3,32	C - Energy production and conversion
pgi	3,27	G - Carbohydrate transport and metabolism
urtD	3,26	R - General function prediction only
glnK	3,26	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_2371	3,24	S - Function unknown
aceA	3,21	C - Energy production and conversion
pckA	3,20	C - Energy production and conversion
Hsero_1670	3,16	S - Function unknown
urtA	3,16	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_2333	3,03	S - Function unknown
atoB	3,02	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_2071	2,98	S - Function unknown
rpmE	2,97	J - Translation, ribosomal structure and biogenesis
Hsero_1196	2,92	S - Function unknown
Hsero_2395	2,89	S - Function unknown
Hsero_3426	2,85	S - Function unknown
mmsA	2,76	C - Energy production and conversion
Hsero_0925	2,74	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_1717	2,72	K - Transcription
Hsero_3599	2,71	S - Function unknown
Hsero_0083	2,70	S - Function unknown
Hsero_0212	2,70	R - General function prediction only
Hsero_1695	2,69	S - Function unknown
Hsero_4228	2,68	S - Function unknown
sbp	2,67	P - Inorganic ion transport and metabolism
amtB	2,67	P - Inorganic ion transport and metabolism
rpmD	2,65	J - Translation, ribosomal structure and biogenesis
Hsero_2368	2,64	S - Function unknown
chrA	2,63	P - Inorganic ion transport and metabolism
mmsB	2,63	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_0502	2,62	S - Function unknown
secE	2,61	U - Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
glnP	2,60	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_3476	2,60	S - Function unknown
pstS	2,58	P - Inorganic ion transport and metabolism
cheY	2,58	T - Signal transduction mechanisms
ssuD	2,57	C - Energy production and conversion
Hsero_3229	2,56	S - Function unknown
Hsero_3838	2,54	P - Inorganic ion transport and metabolism
Hsero_2391	2,54	S - Function unknown

opuBB2	2,53	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_3228	2,53	S - Function unknown
Hsero_2389	2,52	V - Defense mechanisms
Hsero_2359	2,52	R - General function prediction only
Hsero_0522	2,51	R - General function prediction only
Hsero_0046	2,49	R - General function prediction only
Hsero_0927	2,48	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_2905	2,48	S - Function unknown
Hsero_3811	2,48	S - Function unknown
Hsero_0565	2,46	K - Transcription
Hsero_2420	2,44	S - Function unknown
Hsero_3477	2,41	S - Function unknown
Hsero_4518	2,41	S - Function unknown
Hsero_4799	2,40	K - Transcription
Hsero_3594	2,39	S - Function unknown
Hsero_1371	2,39	K - Transcription
Hsero_1575	2,39	S - Function unknown
Hsero_2604	2,36	S - Function unknown
epsF	2,33	M - Cell wall
Hsero_4384	2,33	P - Inorganic ion transport and metabolism
Hsero_0922	2,32	S - Function unknown
pcaR	2,27	K - Transcription
Hsero_2812	2,27	K - Transcription
Hsero_1265	2,24	K - Transcription
Hsero_4196	2,24	R - General function prediction only
Hsero_1553	2,24	C;H - Energy production and conversion;Coenzyme transport and metabolism
Hsero_2805	2,22	S - Function unknown
cheY	2,22	T - Signal transduction mechanisms
Hsero_2360	2,21	S - Function unknown
Hsero_2412	2,20	R - General function prediction only
Hsero_0044	2,20	F - Nucleotide transport and metabolism
Hsero_3478	2,20	S - Function unknown
Hsero_1198	2,19	R - General function prediction only
Hsero_4683	2,18	S - Function unknown
Hsero_3495	2,18	S - Function unknown
Hsero_0027	2,18	S - Function unknown
cheR	2,17	T;N - Signal transduction mechanisms;Cell motility
tauA	2,16	P - Inorganic ion transport and metabolism
Hsero_0599	2,15	P - Inorganic ion transport and metabolism
Hsero_2365	2,15	S - Function unknown
Hsero_2551	2,15	C - Energy production and conversion
Hsero_4565	2,14	G - Carbohydrate transport and metabolism

Hsero_4527	2,14	S - Function unknown
Hsero_2585	2,13	S - Function unknown
cspD	2,13	K - Transcription
betA	2,12	G - Carbohydrate transport and metabolism
Hsero_2363	2,11	S - Function unknown G;E;P;R - Carbohydrate transport and metabolism;Amino acid transport and metabolism;Inorganic ion transport and metabolism;General
Hsero_1028	2,11	function prediction only
Hsero_4094	2,10	S - Function unknown
Hsero_2518	2,09	S - Function unknown
phoB	2,09	P - Inorganic ion transport and metabolism
Hsero_1582	2,09	S - Function unknown
Hsero_2364	2,09	S - Function unknown
ompC	2,09	M - Cell wall
Hsero_1294	2,08	U - Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
Hsero_1355	2,07	S - Function unknown
deoC	2,05	F - Nucleotide transport and metabolism
Hsero_3243	2,05	S - Function unknown
Hsero_3575	2,05	K - Transcription
Hsero_1206	2,05	S - Function unknown
Hsero_4005	2,05	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_3256	2,04	S - Function unknown
Hsero_2060	2,04	S - Function unknown
Hsero_1751	2,04	J - Translation, ribosomal structure and biogenesis
infA	2,03	J - Translation, ribosomal structure and biogenesis
Hsero_0005	2,03	S - Function unknown
Hsero_3475	2,02	S - Function unknown
secY	2,01	U - Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
Hsero_2519	2,01	E - Amino acid transport and metabolism
glnA	2,00	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_1849	2,00	S - Function unknown
rpsK	2,27	J - Translation, ribosomal structure and biogenesis
rpsJ	2,26	J - Translation, ribosomal structure and biogenesis
rpmJ	2,21	J - Translation, ribosomal structure and biogenesis
rpsM	2,05	J - Translation, ribosomal structure and biogenesis

O nível de expressão foi calculado pela razão RPKM naringenina/RPKM controle.

## Anexo II - Genes Reprimidos na presença de naringenina

Gens	Nível de Expressão	Classificação COG
Hsero_2565	-11,19	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_2563	-8,20	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_2564	-7,06	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_2562	-6,96	E - Amino acid transport and metabolism
paaK	-6,39	H - Coenzyme transport and metabolism
Hsero_2566	-6,33	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_1043	-5,64	M - Cell wall
fadD	-5,46	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_3338	-4,07	G - Carbohydrate transport and metabolism
livG	-4,03	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_3340	-3,99	G - Carbohydrate transport and metabolism
Hsero_4704	-3,96	I;Q - Lipid transport and metabolism;Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
Hsero_3330	-3,89	C - Energy production and conversion
Hsero_0648	-3,65	S - Function unknown
Hsero_3329	-3,62	K - Transcription
gdhA	-3,51	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_1033	-3,50	G - Carbohydrate transport and metabolism
Hsero_3198	-3,40	S - Function unknown
Hsero_4705	-3,27	S - Function unknown
mdcG	-3,22	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_3328	-3,17	M - Cell wall
Hsero_2469	-3,09	S - Function unknown
Hsero_2292	-3,06	S - Function unknown
wecB	-3,05	M - Cell wall
glcE	-3,04	C - Energy production and conversion
Hsero_0149	-3,02	S - Function unknown
glcF	-3,00	C - Energy production and conversion
Hsero_3980	-3,00	T - Signal transduction mechanisms
Hsero_0440	-2,96	G - Carbohydrate transport and metabolism
Hsero_1037	-2,95	G - Carbohydrate transport and metabolism
blc	-2,95	M - Cell wall
dctA	-2,93	C - Energy production and conversion
flil	-2,92	N;U - Cell motility;Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
Hsero_1784	-2,88	R - General function prediction only
Hsero_2059	-2,85	S - Function unknown
Hsero_1795	-2,84	L - DNA Replication, recombination and repair
flgl	-2,82	N - Cell motility
chlI	-2,78	H - Coenzyme transport and metabolism
phaC	-2,77	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_3331	-2,77	S - Function unknown

glcD	-2,76	C - Energy production and conversion
Hsero_3333	2,76	S - Function unknown
xylF	-2,76	G - Carbohydrate transport and metabolism
fliJ	-2,75	N;U;O - Cell motility;Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport;Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
Hsero_2321	-2,74	S - Function unknown
cobH	-2,74	H - Coenzyme transport and metabolism
Hsero_0972	-2,73	G - Carbohydrate transport and metabolism
Hsero_2204	-2,73	S - Function unknown
Hsero_3632	-2,71	S - Function unknown
Hsero_4226	-2,70	S - Function unknown
lldD	-2,70	C - Energy production and conversion
livG	-2,67	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_1034	-2,67	G - Carbohydrate transport and metabolism
cheB	-2,59	T - Signal transduction mechanisms
fliK	-2,57	N - Cell motility
Hsero_3339	-2,57	G - Carbohydrate transport and metabolism
flgD	-2,56	N - Cell motility
murG	-2,56	M - Cell wall
Hsero_2372	-2,56	S - Function unknown
fabD	-2,53	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_4543	-2,53	T;N - Signal transduction mechanisms;Cell motility
hpcH	-2,53	G - Carbohydrate transport and metabolism
Hsero_4020	-2,52	G - Carbohydrate transport and metabolism
flhB	-2,52	N;U - Cell motility;Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
Hsero_2223	-2,51	R - General function prediction only
Hsero_1036	-2,50	G - Carbohydrate transport and metabolism
tar	-2,50	T;N - Signal transduction mechanisms;Cell motility
fliG	-2,48	N - Cell motility
Hsero_3615	-2,48	S - Function unknown
accD	-2,47	I - Lipid transport and metabolism
phaB	-2,46	I;Q;R - Lipid transport and metabolism;Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism;General function prediction only
livF	-2,44	E - Amino acid transport and metabolism
cheZ	-2,44	T;N - Signal transduction mechanisms;Cell motility
Hsero_3420	-2,42	E - Amino acid transport and metabolism
ftsA	-2,41	D - Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
iolB	-2,41	G - Carbohydrate transport and metabolism
dctM	-2,40	G - Carbohydrate transport and metabolism
cheD3	-2,40	T;N - Signal transduction mechanisms;Cell motility
Hsero_4278	-2,39	C - Energy production and conversion
Hsero_1325	-2,38	S - Function unknown
wcaG	-2,37	G - Carbohydrate transport and metabolism
bioD	-2,37	H - Coenzyme transport and metabolism



Hsero_4791	-2,37	R - General function prediction only
ggt	-2,36	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_2697	-2,36	S - Function unknown
eda	-2,35	G - Carbohydrate transport and metabolism
flgF	-2,35	N - Cell motility
flgG	-2,34	N - Cell motility
pepP	-2,34	E - Amino acid transport and metabolism
mdcC	-2,34	I - Lipid transport and metabolism
ftsB	-2,33	D - Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
cheD	-2,33	T;N - Signal transduction mechanisms;Cell motility
murC	-2,32	M - Cell wall
ansB	-2,29	J;E - Translation, ribosomal structure and biogenesis;Amino acid transport and metabolism
Hsero_4418	-2,29	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_1130	-2,28	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_4419	-2,28	S - Function unknown
Hsero_4615	-2,28	T;N - Signal transduction mechanisms;Cell motility
azlC	-2,28	E - Amino acid transport and metabolism
murD	-2,28	M - Cell wall
flgE	-2,28	N - Cell motility
Hsero_1271	-2,28	S - Function unknown
Hsero_4702	-2,27	S - Function unknown
Hsero_1617	-2,26	C - Energy production and conversion
		G;E;P;R - Carbohydrate transport and metabolism;Amino acid transport and metabolism;Inorganic ion transport and metabolism;General function prediction only
Hsero_2252	-2,26	
Hsero_3234	-2,26	T;N - Signal transduction mechanisms;Cell motility
		G;E;P;R - Carbohydrate transport and metabolism;Amino acid transport and metabolism;Inorganic ion transport and metabolism;General function prediction only
Hsero_2465	-2,25	
Hsero_2435	-2,25	K - Transcription
Hsero_2768	-2,25	H - Coenzyme transport and metabolism
cobL	-2,24	H - Coenzyme transport and metabolism
Hsero_1712	-2,24	S - Function unknown
atoD	-2,24	I - Lipid transport and metabolism
phnX	-2,24	R - General function prediction only
Hsero_3303	-2,23	R - General function prediction only
Hsero_0300	-2,23	R - General function prediction only
fliO	-2,23	N - Cell motility
Hsero_3754	-2,23	S - Function unknown
gidA	-2,23	D - Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
dctP	-2,23	G - Carbohydrate transport and metabolism
gidB	-2,23	M - Cell wall
hisE	-2,22	E - Amino acid transport and metabolism

flgB	-2,22	N - Cell motility
dctQ	-2,21	G - Carbohydrate transport and metabolism
flgH	-2,20	N - Cell motility
Hsero_2695	-2,20	K - Transcription
fliA	-2,19	K - Transcription
sodC	-2,19	P - Inorganic ion transport and metabolism
mraY	-2,19	M - Cell wall
ardA	-2,19	T - Signal transduction mechanisms
corC	-2,17	P - Inorganic ion transport and metabolism G;E - Carbohydrate transport and metabolism;Amino acid transport and metabolism
Hsero_1040	-2,17	
tauA	-2,16	P - Inorganic ion transport and metabolism
recO	-2,16	L - DNA Replication, recombination and repair
glnQ	-2,16	E - Amino acid transport and metabolism
ftsW	-2,16	D - Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning C;H;R - Energy production and conversion;Coenzyme transport and metabolism;General function prediction only
serA	-2,16	
livK	-2,15	E - Amino acid transport and metabolism
kdpE	-2,15	K;T - Transcription;Signal transduction mechanisms
flgJ	-2,14	N;U - Cell motility;Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
moeA	-2,14	H - Coenzyme transport and metabolism
Hsero_3332	-2,13	S - Function unknown
mdcA	-2,13	I - Lipid transport and metabolism
livH	-2,13	E - Amino acid transport and metabolism
ompW2	-2,13	M - Cell wall
fnr	-2,12	T - Signal transduction mechanisms
Hsero_3627	-2,12	S - Function unknown
Hsero_3421	-2,11	E - Amino acid transport and metabolism
Hsero_0678	-2,11	R - General function prediction only
potD	-2,10	E - Amino acid transport and metabolism
flgC	-2,10	N - Cell motility
Hsero_2708	-2,10	G - Carbohydrate transport and metabolism
Hsero_0061	-2,09	E - Amino acid transport and metabolism
rhtB	-2,09	E - Amino acid transport and metabolism
coxC	-2,09	C - Energy production and conversion
cyoD	-2,09	C - Energy production and conversion
Hsero_2616	-2,09	R - General function prediction only
murE	-2,07	M - Cell wall
Hsero_3383	-2,07	K;T - Transcription;Signal transduction mechanisms
pheC	-2,07	E - Amino acid transport and metabolism
bcp	-2,06	O - Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
Hsero_1039	-2,06	G - Carbohydrate transport and metabolism
flhF	-2,06	N - Cell motility
fliD	-2,05	N - Cell motility

Hsero_3196	-2,05	S - Function unknown
Hsero_1041	-2,05	I;Q;R - Lipid transport and metabolism;Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism;General function prediction only
Hsero_1337	-2,05	T - Signal transduction mechanisms
fadD	-2,04	I - Lipid transport and metabolism
Hsero_0285	-2,04	S - Function unknown
aceE	2,04	C - Energy production and conversion
Hsero_0444	-2,04	G - Carbohydrate transport and metabolism
Hsero_1614	-2,04	L - DNA Replication, recombination and repair
fliR	-2,04	N - Cell motility
Hsero_3626	-2,02	R - General function prediction only
Hsero_3031	-2,02	V - Defense mechanisms
cpdA	-2,02	R - General function prediction only
Hsero_1496	-2,02	E - Amino acid transport and metabolism
phoH	-2,01	T - Signal transduction mechanisms
mdcB	-2,00	H - Coenzyme transport and metabolism
Hsero_0311	-2,00	S - Function unknown
flgA	-2,00	N;O - Cell motility;Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
Hsero_3036	-2,00	R - General function prediction only
Hsero_3633	-2,00	F - Nucleotide transport and metabolism
Hsero_0148	-1,99	E - Amino acid transport and metabolism
wcaA	-1,99	M - Cell wall
Hsero_4015	-1,99	S - Function unknown
Hsero_0254	-1,99	I - Lipid transport and metabolism